

神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系における シヌクレイン取り込みに関与する分子機構の解析

著者	今野 昌俊
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15640号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58482

博士論文

神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系における α シヌクレイン取り込みに関与する分子機構の解析

東北大学大学院医学系研究科

神経感覚器病態学講座 神経内科学分野

今野 昌俊

略語

Ab: antibody; CBB: Coomassie Brilliant Blue; DDC: dopa decarboxylase; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DN: dominant-negative; *E. coli*: *Escherichia coli*; EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein; ER: endoplasmic reticulum; GCI: glial cytoplasmic inclusion; HMW: high molecular weight; IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; LB: Lewy body; MSA: multiple system atrophy; PD: Parkinson's disease; PrP: prion protein; PVDF: polyvinylidene difluoride; RIPA: radio-immunoprecipitation assay; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; siRNA: small interference RNA; SSRI: selective serotonin-reuptake inhibitor; TBST: Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20; TPPP/p25 α : tubulin polymerization promoting protein/p25 α ; VPS4: vacuolar protein sorting 4; wt: wild-type; α SYN: α -synuclein; β SYN: β -synuclein; γ SYN: γ -synuclein.

要約

パーキンソン病 (PD)やアルツハイマー病 (AD)をはじめとする神経変性疾患において、ミスフォールディングタンパクの沈着は病理学的指標であるばかりでなく、神経細胞死につながる重要なステップと考えられている。近年これらの疾患において、異常凝集タンパクがプリオンの様に細胞間を伝播し周辺細胞に病変を拡大させる可能性が示され注目を集めている。PD に関しては、培養細胞あるいは嚙歯類モデルにおいて患者脳内神経細胞に蓄積する凝集化 α シヌクレイン (α SYN)が神経-神経、神経-グリア細胞間を伝播し、病変を周辺細胞へと拡大させる可能性が示されている。さらに PD 関連疾患である多系統萎縮症 (Multiple system atrophy, MSA)患者脳では、 α SYN を発現していないオリゴデンドログリア内に α SYN 陽性の細胞内凝集体 (Glial cytoplasmic inclusion, GCI)が認められ、同細胞への α SYN 取り込みがその病態発現に寄与している可能性が示唆されている。異常タンパク伝播説は神経変性過程を説明する病態仮説として魅力的である一方、その背景にある分子メカニズムについてはなお不明な点が多い。本研究では培養細胞系を用い、神経モデル細胞およびオリゴデンドログリアモデル細胞への α SYN 取り込み現象を確認すると共に、同過程に関与する細胞内分子機構の探索を行った。本研究では、(i) 培養ヒトドパミン神経およびオリゴデンドログリアモデル細胞系において、 α SYN は経時的・濃度依存的に細胞内へと取り込まれた後凝集化を生じ、患者脳内の細胞内封入体と類似した染色特性を有する凝集体形成を誘導することを確認した。さらに (ii) 細胞内に取り込まれた α SYN の一部はリソソーム・オートファジー系にて分解処理されることを明らかにした。また、(iii) クラスリン依存性エンドサイトーシスの制御分子である dynamin 分子の発現抑制により神経モデル細胞への α SYN 取り込み

が顕著に抑えられること、および (iv) 強力な dynamin 阻害作用を有する抗うつ薬 sertraline が、神経・オリゴデンドログリアモデル細胞での α SYN 取り込みを低減させ、 α SYN の細胞間伝播を抑制することを証明した。これらの新知見は未だ詳細の解明されていなかった α SYN の神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系内への取り込み・分解に関与する細胞内小胞輸送系について、その一部を科学的に実証した点で先駆的意義を有するものである。さらに、細胞間異常タンパク伝播は異常タンパク蓄積を背景とする神経変性疾患に共通してみられる病態メカニズムとの考えもあり、我々の見いだした α SYN 細胞間伝播に関与する分子機構は、これらの疾患に共通した病態機構かつ治療ターゲットとなる可能性がある。

研究背景

神経変性疾患とは、中枢神経の中の特定の神経細胞群が徐々に変性し、細胞死に陥る疾患を総称し、PD、MSA、AD、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などが代表的疾患として知られている。これらの疾患に共通した病理・生化学的異常として、異常凝集タンパクの患者脳の細胞内外への蓄積が認められる。このことから、異常凝集タンパク病とも総称されている。主な蓄積タンパクとしては、AD、進行性核上性麻痺 (PSP)、ピック病 (PiD)などの疾患で認められる tau、ADなどの疾患で認められるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$)、ALS、FTLD などの疾患で認められる TDP-43、PD、MSA などの疾患で認められる α SYN などが挙げられる。これらの異常凝集タンパクは ER ストレスや酸化的ストレスなどを惹起して細胞傷害性に作用し、神経変性に密接に関与することが明らかとなっている¹⁾²⁾。凝集タンパク病の中でも α SYN が異常蓄積する疾患をシヌクレイノパチ

一と総称しており、PD、MSA などが代表的疾患とされる。 α SYN が異常蓄積した結果、PD においては神経細胞内に認められるレビー小体³⁾、MSA においてはオリゴデンドログリア内に認められるグリア細胞内封入体 (GCI)が出現する⁴⁻⁶⁾ (Fig. 1)。レビー小体の好発部位は、中脳黒質、青斑核、迷走神経背側核などである。PD では中脳黒質ドパミンニューロン変性が生じ、臨床的には、安静時振戦、筋強剛、無動、寡動などの運動症状を呈する他、認知症、うつのような非運動症状も出現する。有病率は 10 万人あたり 100-150 人と推定され、発症年齢は 50 から 65 歳に多いが、高齢になるほど発病率が増加する。大部分 (95%) は孤発性であるが、一部、遺伝性の症例もある。一方、MSA は病理学的には、線条体の他、黒質、小脳皮質や橋核、オリーブ核などの神経変性、GCI の存在を特徴とする進行性変性疾患である。有病率は 10 万人あたり 10 人程度と推定され、発症は 50 歳台に好発する。臨床的には、自律神経症状、小脳症状、パーキンソニズムなどの症状が認められる。進行は PD よりも急速で平均経過は 5 から 7 年である。ヒト α SYN は 140 アミノ酸からなる機能不明のタンパクでシナプス前末端に豊富に存在し、構造的には KTKEVG のアミノ酸モチーフの繰り返し配列をもち、両親媒性の N 末ドメイン、中央部の疎水性 NAC (non-A β component of AD amyloid) ドメイン、および陰性に荷電し金属類に結合性を示す C 末ドメインから構成される²⁾ (Fig. 2)。Native な状態の α SYN は α ヘリックス構造をとり生体膜に結合するか、あるいは不定の構造をとり細胞質に存在しているが、A30P、A53T のような点変異、酸化ストレスなどにより線維・凝集化を生じることが知られている³⁾。 α SYN はフィブリル形成に至る線維化の過程の中で α ヘリックス構造と β シート構造を種々の割合で併せ持つ様々な中間体を生じるが、成熟したフィブリルよりもプロトフィブリルとよばれる可溶性中間体に強い細胞毒性が認められる⁷⁻¹⁰⁾ (Fig. 3)。

これまで α SYN は専ら細胞内で機能するタンパクであると考えられてきた¹¹⁾¹²⁾。しかし、最近の研究では神経細胞内に存在するモノマー・オリゴマー α SYN がエキソサイトシスあるいはエキソソームなどの機構により細胞外環境へ分泌されることが明らかとなってきた¹³⁾¹⁷⁾。神経細胞の培地に添加した可溶性 α SYN オリゴマーは細胞膜を超えて細胞内へ侵入後凝集を生じ、細胞傷害性に作用することも報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに共培養系や嚙歯類を用いた動物モデルにおいて、神経細胞から放出された α SYN が周辺細胞へと移動し封入体を形成することが確認されている²⁰⁾。これらの事実は、 α SYN は細胞内にのみ留まらず、細胞外環境へと分泌され周辺細胞の機能へ影響を与えていることを示している²¹⁾²³⁾。プリオン仮説あるいはタンパク癌仮説ともよばれる異常タンパク伝播現象は、胎児黒質神経細胞移植を受けた PD 患者剖検脳において、ドナー由来の神経細胞内に α SYN 陽性のレビー小体が認められたという結果や²⁴⁾²⁶⁾、MSA 患者脳内において α SYN mRNA 発現が認められないにも関わらず、同患者脳内のオリゴデンドログリア内に α SYN 陽性の GCI が認められるという事実²⁷⁾²⁹⁾、さらには Braak らの提唱する PD 患者脳における α SYN 病理の topographic progression (いわゆるレビー病理脳幹上行仮説)³⁰⁾ (Fig. 4)の背景病態としても理解可能であるといえる。PD、MSA において細胞外の α SYN が神経細胞、あるいはオリゴデンドログリア細胞内に取り込まれ、封入体を形成すると考えられている。しかし、 α SYN の細胞内取り込みに関する機構としては、エンドサイトシス¹⁹⁾²⁰⁾、エキソソーム小胞を介する機構³¹⁾、形質膜の貫通¹⁹⁾、および細胞膜ナノチューブ (tunneling nanotubes)³²⁾などが報告されているが (Fig. 5)、詳細な機構については未だ不明な点が多い。今回、我々は既存の研究に加え、 α SYN 取り込みに関してさらに検討を行うとともに、 α SYN 取り込み阻害、さらには封入体形成阻害を基軸とした新たな治療介入の可能性を示したいと考えた。

研究目的

多くの神経変性疾患において、病初期に特定の領域に病理変化を生じ、時間経過と共に周辺へと拡大してゆく現象は、臨床症状、病理および画像所見の観察から容易に推定される事実である。近年これを裏づけるように PD などの神経変性疾患において、神経細胞内異常凝集タンパクが細胞間を伝播し周囲へと病変を拡大させる現象が、剖検脳、培養細胞および動物モデルにおいて相次いで報告されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。病原性タンパク伝播により病理変化が周辺組織へ拡大するというプリオン仮説・タンパク癌仮説は、異常タンパク凝集を病理学的特徴とする神経変性疾患に共通した病態機序である可能性がある一方、その背景にある分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では PD、MSA といった α SYN 陽性細胞内凝集体を病理学的特徴とする神経変性疾患を対象として神経-神経、あるいは神経-グリア間における異常タンパク伝播、主に取り込みに関与する分子機構を解明するとともに、その阻止を基軸とした新しい変性疾患の進行予防治療の可能性を提案することを最終目的とする。

実験材料と方法

プラスミドの構造、精製

大腸菌での組換えタンパク発現の目的でヒト野生型 α SYNcDNA を pGEX-6P-1 大腸菌発現ベクター (GE Healthcare) の *Sal* I / *Not* I 認識部位にサブクローニングした。N 末端に mCherry を付与したヒト野生型 α SYNcDNA は pcDNA3.1+真核細胞用発現ベクター (Life Technologies) の *Kpn* I / *Xho* I 認識部位に組み込んだ。ヒ

ト野生型および K44A ドミナントネガティブ (DN)変異 dynamin 1 を組み込んだ pEGFP-C1 発現ベクターは、聖マリアンナ医大の三好先生より譲渡頂いた³³⁾。各プラスミド DNA は Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche)を用いて精製し、DNA シーケンスにて配列を確認した。

リコンビナント α SYN 精製

ヒト野生型 α SYNcDNA を組み込んだ pGEX-6P-1 ベクターを用い、大腸菌 BL21(DE3)pLysS をトランスフォームした。同大腸菌をアンピシリン 100 μ g/ml、クロラムフェニコール 35 μ g/ml を含む LB 培地中で $A_{600}=0.4$ に到達するまで 37°C 下にて振盪培養を行った。次いで 0.5 mM の Isopropyl β -D-1-thiogalactoside (IPTG)を添加し発現誘導後さらに 5 時間培養を継続した。培養終了後遠心分離により集菌し、氷冷した PBS で懸濁したのち超音波破碎機で菌体を破碎した (Max output, 10 sec x 6 回; Smurt NR-50, Microtec)。不溶性の debris を取り除いた上清を PBS で平衡化したグルタチオンセファロース 4B カラム (GE Healthcare)にアプライした。氷冷 PBS で 3 回洗浄後、カラムに 10 mM グルタチオン溶出バッファーを添加し GST- α SYN 融合タンパクを溶出した。溶出サンプルは PBS にて 4°C 条件下で攪拌を加えながら一晩透析し脱塩処理を行った。透析後のサンプルを 4°C 条件下で Prescission Protease (2 units per 100 μ g protein, GE Healthcare)と反応させ、グルタチオンセファロース 4B カラムに再度アプライして GST タグを除去し flow through 中の α SYN タンパクを回収した。得られたリコンビナント α SYN の純度はクマシーブリリアントブルー染色 (CBB)および α SYN 抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。 β SYN、 γ SYN、および家族性 PD 関連 A30P・A53T 変異型 α SYN の各リコンビナントタンパクは ATGen 社より購入した。

細胞培養とトランスフェクション

ドパミン系神経モデル細胞 (SH-SY5Y細胞・ラットPC12細胞)およびヒトオリゴデンドログリアモデル細胞 (KG1C細胞・MO3.13細胞)は4.5 g/L グルコース、2 mM L-グルタミンおよび10% FBSを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培地 (Life Technologies/GIBC)を用い37°C、5% CO₂/air条件下にて培養した。SH-SY5Y細胞・PC12細胞はAmerican Type Culture Collection (ATCC)から、KG1C細胞はRIKEN BRCよりそれぞれ購入した。細胞へのプラスミドDNA導入はLONZA社の4D-Nucleofectorを用い、プロトコールに準拠して行った (1.5×10^6 細胞あたり2 μ g相当のプラスミドDNAもしくはsiRNAを使用)。トランスフェクション48時間後に細胞を回収し、以降の実験に供した。mCherry、mCherry- α SYNおよびEGFP発現細胞についてはG418硫酸塩 (InvivoGen) 300 μ g/mlでセクションを行い安定発現株を樹立した。

ラット大脳皮質神経細胞の初代培養

ラット大脳皮質神経の初代培養は既出の論文の方法に則って行った³⁴⁾。初代培養細胞 (0.5×10^6)をpoly-D-lysineコート済みのカバーガラス上に蒔き、2% B27, 25 mM glutamate, 18 mM glucoseおよび0.5 mM L-glutamine含有Neurobasal-A培地 (Life Technologies/GIBCO)中で維持した。3日毎に培地を交換し、培養開始6日目に5 μ Mのリコンビナント α SYNを24時間曝露後に免疫染色に供した。実験は3回実施し再現性について確認した。

siRNA を用いた内因性 dynamin のサイレンシング

前述の 4D-Nucleofector を用い、プロトコールに従い 2×10^6 個の SH-SY5Y 細胞に 2 μ g 相当のヒト dynamin 1 特異的 siRNA (sc-43737)あるいはコントロールで

ある scrambled siRNA (sc-36869)を導入した。siRNA 導入 72 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロットにてサイレンシング効果を確認した。各実験は最低 3 回実施し再現性について確認した。

共培養実験

α SYNを分泌するドナー細胞であるmCherry- α SYN発現SH-SY5Y細胞 (2×10^5 cells per 3.5cm dish)と、アクセプター細胞となるEGFP発現PC12神経モデル細胞あるいはMO3.13オリゴデンドログリアモデル細胞 (2×10^5 cells per 3.5cm dish)を共培養した。10 μ Mのsertraline (Sigma)の存在・非存在下にて5日間培養を継続し、赤色蛍光を発するmCherry- α SYN分子のアクセプター細胞内への移行を観察した。顕微鏡画像の取得は共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV300, OLYMPUS)により行った。顕微鏡下に5視野をランダムに選択し、各視野毎に250-300個の緑色蛍光を呈するアクセプター細胞中にみられるドナー由来の赤色蛍光を発する α SYN凝集体数をカウントした。各実験は最低4回実施し再現性について確認した。

細胞分画調製とウェスタンブロット解析

α SYN曝露細胞をセルスクレイパーにて回収し、氷冷PBSで2回洗浄後にMem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent kit (Thermo Scientific)を用い、膜タンパク成分からなる疎水性画分と細胞質を含む親水性画分に分離した。一部の実験では α SYN曝露に先だちリソソーム阻害剤であるbafilomycin A1 (0-5 nM, 24時間)あるいはdynamin阻害作用のあるsertraline (0-10 μ M, 30分間)で細胞を前処理した。サンプルのタンパク濃度はBCA法 (Thermo Scientific)にて測定した。50 μ g 相当の cell lysate を SDS- ポリアクリルアミドゲル (12.5%) または

Native-PAGE (10-20% gradient gel)にて140 V低電圧で泳動後、100 Vで2時間PVDFメンブレン (Immobilon-P; Merk Millipore)に転写した。一部についてはCBB R-250染色でも泳動結果を確認した。疎水性・親水性分画の分離については、細胞質マーカーであるHsp90、形質膜マーカーであるNa⁺/K⁺ ATPaseの発現により確認した。転写後のメンブレンは5%スキムミルク/Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST)で30分間ブロッキング処理し、TBSTバッファで3回洗浄後以下の一次抗体と4℃で一晩反応させた：anti-synuclein-1 (63320, 1:1000; BD Bioscience), anti- α SYN (#2628, 1:1000; CST), anti-GST (#2625, 1:1000; CST), anti-LC3 (PM036, 1:1000; MBL), anti-caspase 3 (H-277, 1:2000; SantaCruz), anti-cleaved caspase 3 (Asp 175, 1:1000; CST), anti-dynamin 1 (3G4B6, 1:1000; CST), anti-dynamin 2 (610263, 1:4000; BD Transduction), anti-dopadecarboxylase (DDC) (AB1569, 1:1000; Millipore), anti-TPPP/p25 α (EPR3315, 1:1000; Epitomics), anti-GFP (M048-3, 1:2000; MBL), anti-Na⁺/K⁺ ATPase α (D154-3, 1:20000; MBL), anti-Hsp90 (AC88, 1:2000; Stressgen), anti- α -tubulin (clone DM1, 1:1000; Sigma), anti-mCherry (5993, 1:1000; BioVision)。二次抗体にはHRP-conjugated anti-mouse IgGまたはanti-rabbit IgG (1:10000; JacksonImmunoResearch)を使用した。メンブレンに発色基質Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) 2 mLを添加し室温で5分反応後、LAS-3000 mini image analyzer (Fujifilm)で画像を取得した。各実験は最低4回実施し再現性について確認した。

免疫組織化学染色

Poly-L-Lysineコート済カバーガラス上で培養した細胞を4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分間固定し、0.5% TritonX-100/PBSで5分間透過処理した。続いて3% goat serumを含むPBSで30分間ブロッキング処理後、以下の一次抗体と1時間

室温にて反応させた：anti-synuclein-1 (1:1000), anti- α SYN (#2628, 1:2000), anti-Serine 129 phospho- α SYN (EP1526Y, 1:1000; Epitomics), anti- γ -tubulin (GTU-88, 1:4000; Sigma), anti-peripherin (AB1530, 1:1000; Millipore), anti-vimentin (V9, 1:500; Sigma), anti-ubiquitin (P4D1, 1:1000; Santa Cruz), anti-MAP2 (#4542, 1:1000; CST), anti-tubulin polymerization promoting protein/p25 α (TPPP/p25) (EPR-3315, 1:1000), anti-Rab5A Ab (S-19, 1:1000; Santa Cruz), anti-Lamp-1 (H4A3, 1:1000; DSHB)。アミロイド線維は検体を0.03%チオフラビンS (Sigma)溶液に5分間振盪後、70%エタノールで洗浄し検出した。一次抗体と反応終了後、検体をPBSで3回洗浄し、Alexa 488およびAlexa 568-conjugated goat-anti-mouse IgGあるいはgoat-anti-rabbit IgG二次抗体 (1:4000; LifeTechnologies/MolecularProbes)と遮光条件下で1時間反応した。核染色にはTO-PRO3 iodide (1:1000; Molecular Probes)を用いた。顕微鏡画像の取得は共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV300)により行った。 α SYN陽性の封入体数の定量に際しては、ランダムに選んだ5視野において250-300個の細胞あたりの封入体数をカウントし算出した。各実験は最低4回実施し再現性について確認した。

実験結果

ヒト α SYN リコンビナントタンパクの精製結果

精製したリコンビナント α SYNの性状についてCBBおよびウェスタンブロット法で確認した。GST- α SYN融合タンパクはSDS-PAGE条件下では44 kDa付近に検出され、Prescission proteaseによるGSTタグ切断後にはモノマー α SYNが18 kDa付近に検出された (Fig. 6A (a))。一方、Native-PAGE下では大部分の α SYNは3量体に相当する54 kDa付近に検出された (Fig. 6A (b))。リコンビナント

α SYN は 24 時間、37°C 下で培地中においてもオリゴマー化を生じることはなかった (Fig. 6A (c))。

α SYN は神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系に取り込まれオリゴマー化する

SH-SY5Y 神経モデル細胞、KG1C オリゴデンドログリアモデル細胞³⁵⁾³⁶⁾を 5 μ M α SYN 存在下で一定時間培養し、疎水性画分と親水性画分に分離後ウェスタンブロット法にて細胞内へ取り込まれた α SYN の検出を行った (Fig. 6B (a), (b))。オリゴデンドログリアのマーカータンパクには CNPase および myelin basic protein (MBP) を用いた³⁷⁾。図に示すとおり α SYN 添加 1 分後にはすでに細胞内の主に親水性画分に α SYN モノマーが検出され、以後経時的に SDS 抵抗性である 2-3 量体の α SYN 出現・増加が同画分において確認された。次に培地に添加する α SYN 濃度を 0-10 μ M とし一定時間 (24 時間)細胞を培養したところ、濃度依存的に α SYN モノマー・オリゴマーの出現が確認された (Fig. 6B (c))。以上は BD Bioscience 社の synuclein-1 抗体を用いた結果であるが、他社の α SYN 抗体 (#2628, CST)を使用したブロットにおいても同様に細胞内 α SYN モノマー・オリゴマーの検出を確認している (Fig. 6B (d))。細胞内親水性画分における α SYN モノマーの増加量はデンストメトリー解析でも定量を行っている (Fig. 7A)。さらに培地由来の外來性 α SYN と神経モデル細胞がもつ内在性 α SYN を区別するため、GST- α SYN を使い同様の曝露実験を行ったところ、抗 GST 抗体で認識される凝集化 GST- α SYN 多量体を親水性画分において検出することが出来た (Fig. 7B)。以上の結果より、細胞外 α SYN は経時的・濃度依存的に神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系へと取り込まれ、オリゴマー・多量体 α SYN を形成することが確認された。

哺乳類の SYN には α 、 β 、 γ の 3 種類が存在するが³⁸⁾、SH-SY5Y 神経モデル細胞を用いた曝露実験では α SYN のみがほぼ選択的に細胞内へ取り込まれることが判明した。また野生型 α SYN と比較し、凝集性が高く細胞毒性が高いとされる A30P・A53T 家族性 PD 関連変異型 α SYN は、細胞内へ取り込まれた後より顕著な α SYN 多量体形成をもたらすことが示された (Fig. 8)。

α SYN 曝露により神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系に細胞質内封入体形成される

続いて α SYN 添加培地にて培養した神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系における α SYN 陽性封入体の出現について、免疫染色法による確認を行った。5 μ M α SYN を 24 時間培地に添加したところ、神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系の細胞質内に α SYN 陽性の顆粒状の凝集物に加え、核近傍に大型の封入体出現が認められた。いずれの構造物もユビキチンおよびチオフラビン S 陽性であった。PD 患者脳内に蓄積する α SYN の 9 割以上は Ser129 部位でリン酸化を生じていることが知られているが、上述の大型の封入体のみが Ser129 α SYN 陽性であった (Fig. 9A (a), (b))。さらに、Fig. 9B (a), (b)で示す通り、核近傍にある大型の封入体はレビー小体のマーカーである γ -tubulin、peripherin、および vimentin と共存していた²⁾。また KG1C の α SYN 陽性の封入体は、GCI のマーカーとされる TPPP/p25 α と共存していた³⁷⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。 α SYN 陽性の封入体は、SH-SY5Y 神経モデル細胞のみならず primary rat cortical neuron を用いた実験でも確認された (Fig. 9C)。SH-SY5Y、KG1C 細胞において、核近傍の α SYN 陽性封入体を有する細胞の頻度は時間と共に増加し、 α SYN 曝露 24 時間後にはそれぞれ 35%、24%であった (Fig. 9D)。

リソソーム機能阻害により α SYN オリゴマー形成は増大する

細胞内に取り込まれた α SYN の subcellular distribution について、免疫染色法による検討を行った。 α SYN 曝露により出現する α SYN 陽性封入体の一部は、初期エンドゾームマーカー (Rab5A) およびリソソームマーカー (Lamp-1) と共存していた (Fig. 10A)。取り込まれた α SYN がリソソームで分解をうけているか確認するために、予め V 型 ATP アーゼ特異的阻害剤である bafilomycin A1 (0-5 nM) にて 24 時間処理した SH-SY5Y 細胞を用い、5 μ M α SYN 存在下でさらに 24 時間培養を行った (Fig. 10B)。未処理のコントロールと比べ bafilomycin A1 処理群では主に親水性画分において高分子 α SYN オリゴマーが蓄積する傾向が確認された。また、bafilomycin A1 添加後には macroautophagy および autophagosome の増加を示す LC3-II の増加が認められた。一方、アポトーシスの指標である cleaved caspase-3 は検出されなかった (Fig. 10C)。以上の結果から、 α SYN 曝露神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系ではリソソーム阻害剤存在下にて autophagic flux が増大していることが示唆された。

α SYN の細胞内取り込みは dynamin GTPase 阻害により抑制される

クラスリン依存性エンドサイトーシス過程においては細胞膜とクラスリン被覆小胞 (clathrin coated vesicle) の離断は dynamin 分子により実行される (Fig. 11)。エンドサイトーシスを抑制する低温条件下での培養や、dynamin 1 の K44A DN 変異体を COS7 細胞あるいは primary astrocyte に過剰発現させると、細胞外 α SYN 取り込みが有意に減少することなどから α SYN の細胞内取り込みにはエンドサイトーシスが関与すると推測されてきた²¹⁾⁴¹⁾⁴²⁾。一方、Lee らは α SYN オリゴマーはエンドサイトーシスにて細胞へと取り込まれるのに対し、 α SYN モノマーは非エンドサイトーシスの機構が関与する可能性を指摘している¹⁹⁾⁴²⁾。哺乳動物

の dynamin には 1・2・3 の 3 つのサブタイプが存在するが、うち dynamin 1・2 がクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与している⁴³⁾。dynamin 1 は神経系に特異的な発現を示す一方、dynamin 2 は ubiquitous な発現パターンを呈することが知られている³²⁾⁴⁴⁾。これらの知見を下に、我々は細胞外 α SYN の神経およびオリゴデンドログリアモデル細胞への取り込みにおける dynamin GTPase の機能的役割を調べた。実験に先立ち複数の神経モデル細胞とオリゴデンドログリアモデル細胞の細胞株を用い、dynamin 分子の発現プロファイルを確認した (Fig. 12A)。dynamin 2 は神経、オリゴデンドログリアモデル細胞両者に発現する一方、dynamin 1 は SH-SY5Y・PC12 といったドパミン神経モデル細胞に強く発現していた。

薬理学的な dynamin GTPase 阻害剤には複数知られているが、抗うつ薬である selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) は class effect として dynamin GTPase 活性を抑制することが知られている⁴³⁾。なかでも第 2 世代 SSRI である sertraline は既知の dynamin 阻害剤の中で最強の抑制効果を示すと報告されている³²⁾⁴⁴⁾。そこで SH-SY5Y 神経モデル細胞および KG1C オリゴデンドログリアモデル細胞を sertraline (0-10 μ M) で 24 時間処理後に、培地に 5 μ M α SYN を添加し細胞内移行について確認したところ、何れの細胞株においても sertraline は濃度依存的に α SYN の取り込みを有意に減少させることが判った (Fig. 12B(a), (b))。さらに SH-SY5Y 細胞を用いて K44A DN 変異型 dynamin 1 あるいは dynamin 1 特異的 siRNA で同分子の機能を抑制すると、コントロール細胞と比べ α SYN の細胞内取り込みが著しく抑制されることが判明した (Fig. 12C(a), (b))。これに反して野生型 dynamin 1 の過剰発現では細胞内の SDS 不溶性 α SYN オリゴマーはコントロール細胞に比べ増加していた。

Sertraline は α SYN のモデル細胞間伝播を抑制する

dynamin 阻害活性をもつセルトラリンが α SYN モデル細胞間伝播を抑制させるか否かを検討するために、神経-神経あるいは神経-オリゴデンドログリアモデル細胞による共培養系を用いた実験を行った。 α SYN 分泌を担うドナー細胞として mCherry- α SYN を安定発現する SH-SY5Y 細胞を、培地中の α SYN を取り込むアクセプター細胞として、EGFP を安定発現する PC12 ドパミン神経モデル細胞または MO3.13 オリゴデンドログリアモデル細胞をそれぞれ準備した。sertraline (10 μ M) 存在・非存在下条件においてドナー・アクセプター細胞を共培養し、72 時間後に赤色蛍光標識された α SYN のドナーからアクセプター細胞への移動を、共焦点レーザー顕微鏡下に観察した (Fig. 13A)。ドナーに mCherry- α SYN を使用した共培養では、mCherry- α SYN を有するアクセプター細胞の出現頻度は PC12 で 4.2%、MO3.13 で 3.8%であった。一方、コントロールとして mCherry のみを過剰発現したドナー細胞を用いた場合の封入体陽性アクセプター細胞の頻度は、両者とも 0.2%以下であった (Fig. 13A, B)。次に sertraline 添加培地で同様の実験を行ったところ、アクセプター細胞に取り込まれた mCherry- α SYN の量は有意に減少した (Fig. 13B)。なお、sertraline 処理はドナー細胞からの mCherry- α SYN 分泌には影響を及ぼさなかった (Fig. 13C)。

考察

生理的条件下では α SYN は主に細胞質に存在しているが、膜リン脂質や細胞内小胞と親和性を有することが知られている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。一方、細胞内 α SYN の一部は、ER-ゴルジ体分泌経路介して細胞膜外へと分泌されとの報告があり⁴⁷⁾、実際、血液・髄液などの体液に加え神経細胞培地上清中に細胞外 α SYN が存在す

ることが明らかとなっている⁴⁸⁾⁴⁹⁾。細胞外環境に存在する α SYN モノマー・オリゴマーは隣接する細胞に再取り込みされることにより、活性酸素種の産生、ミクログリアの活性化あるいはシナプス機能不全などさまざまな noxious effect を誘導し、細胞毒性を示す可能性も示唆されている¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾。今回我々は SH-SY5Y 神経モデル細胞・KG1C オリゴデンドログリアモデル細胞がともに細胞外 α SYN を取り込み、SDS 抵抗性の凝集化 α SYN を細胞内に蓄積させ、レビー小体・GCI 類似の細胞質封入体を形成することを確認した。内因性 α SYN を発現していない KG1C 細胞と異なり、内因性 α SYN を有する SH-SY5Y 細胞では、細胞外由来の α SYN と内因性 α SYN とともに α SYN オリゴマー・凝集体形成に関わっている可能性がある。また過去の報告と同様、細胞内に取り込まれた α SYN の殆どは、疎水性画分ではなく親水性画分に存在していることを確認した。野生型 α SYN は Hsc70 の作用を受けシャペロン介在性オートファジーにより分解されるとされ、PD 患者脳組織ではリソソーム機能障害が認められ、これが α SYN 蓄積を誘導する一つの要因であると示唆されている⁵⁰⁾⁻⁵³⁾。本研究では神経・グリアモデル細胞内に取り込まれた α SYN がエンドソーム、リソソームへと輸送され分解される可能性を示すと共に、リソソーム障害下において autophagic flux を増加させることを証明した。これらの結果は、細胞内に取り込まれ蓄積した α SYN オリゴマーのクリアランスおよび細胞内環境の恒常性維持にリソソーム機能が重要であることを示唆するものと考えられる。

PD におけるレビー小体同様、MSA 患者脳内における α SYN 陽性 GCI の形成過程については以前から多くの議論がある²⁹⁾⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾。内因性 α SYN を発現していないオリゴデンドログリア内に如何なる機構で α SYN が出現、蓄積するのかは未だよく分かっていない²⁸⁾。一方、近年話題となっている異常タンパク伝播説を考慮すると、MSA 脳内では神経細胞から分泌された α SYN をオリゴデンドロ

グリアが積極的に取り込んでいる可能性も考えられる。これを支持する証拠として、Rab4 や Rabaputin-5 といったエンドサイトーシス関連分子が GCI 中に認められるという事実が挙げられる⁵⁷⁾。本研究では細胞外 α SYN がオリゴデンドログリア内に移行し、SDS 抵抗性オリゴマーおよび GCI 様の封入体を形成することを実験的にはじめて証明した。これまでタンパクのミスフォールディングを病態背景とする疾患 (misfolding disease) ではいわゆる‘seeding-nucleation’説に従い異常タンパクの凝集・蓄積が生じると推定されてきた⁵⁸⁾⁻⁶⁰⁾。即ち、異常凝集 α SYN を有する神経細胞から分泌されたミスフォールド α SYN が隣接細胞へと移動し、同細胞内に存在する unfolded α SYN を β -sheet 構造を有する α SYN へと構造変化させる鋳型として働くことが推定されている。一方、我々の研究では、内因性の α SYN を有さないオリゴデンドログリアにおいても、 α SYN への曝露により細胞内に α SYN オリゴマー・凝集体の蓄積が生じ得ることが示された。この事実は、凝集化 α SYN タンパクの細胞内蓄積はドナー細胞外由来の α SYN オリゴマーのみでも起こりえる現象であり、レシピエント細胞内での α SYN 分子の存在は必須ではないことを示唆している。近年、オリゴデンドログリア内に豊富に存在する Tublin Polymerization promoting Protein (TPPP) が *in vitro* で α SYN の凝集促進を有することが見出された。さらに、MSA 患者脳では、通常ミエリン鞘に存在する TPPP が細胞質に異所性に存在するという結果も報告されており、GCI 形成とオリゴデンドログリア変性に同タンパクが関与していることが示唆されている³⁷⁾。この知見を考慮すると、‘seeding-nucleation’説のみが異常タンパク凝集を説明しうるものではないことを示しているものと思われる。

神経・グリア細胞における α SYN の分泌・吸収・分解に関与する分子機構については複数の説があり、未だ一定の結論は得られていない。Lee らは培養神経モデル細胞において、エキソサイトーシスを抑制させる低温条件下にて α SYN

の細胞外分泌が有意に減少することから、同機構が α SYN 分泌に重要であると主張している⁴²⁾。MES 細胞において α SYN 分泌は ER-ゴルジ体依存エキソサイトーシス阻害剤である brefeldin A により抑制されないことから、 α SYN 分泌には unconventional なエキソサイトーシス経路が関与する可能性が示唆されている⁶¹⁾。ヒト培養モデル神経細胞における実験では、 α SYN 取り込みには初期エンドソーム関連分子である small Rab GTPase の一種 Rab5 が重要な役割をもつとの報告がある¹⁸⁾。また酵母モデルを用いた検討では、A30P 変異 α SYN は形質膜上に存在する積荷輸送タンパク YPP1 と結合し、受容体介在性エンドサイトーシスにより細胞内へ導かれたのち液胞内で分解されることが示されている⁶²⁾。さらに我々を含めた複数の研究グループは、神経モデル細胞からの α SYN 分泌にはリサイクリングエンドソーム機能を司る Rab11a が関与することを報告している⁶³⁾⁶⁴⁾。プリオンの場合、正常プリオン (PrPc) と pathogenic form である PrPsc は共にエキソソームとよばれる細胞外の nanovesicle を介して分泌され、患者髄液に含まれるエキソソームには強い感染性があることが判っている⁶⁵⁾⁶⁶⁾。このエキソソームが α SYN 分泌に関与しているか否かについても賛否両論がある。Emmanouilidou らのグループは、 α SYN はエキソソームを介して細胞外へ分泌され、 α SYN 発現神経モデル細胞培地から調製したエキソソーム小胞を他の細胞へ添加すると神経細胞死が誘導されると報告している³¹⁾⁶⁷⁾。一方、我々の検討では、健常人・PD 患者髄液髄液や神経細胞培地上清中のエキソソームに含まれる α SYN はプリオンと比べごく僅かであり、エキソソームは細胞外 α SYN の主要存在部位でないことが推察された⁶³⁾。また、エキソソーム形成に必須である AAA 型 ATPase VPS4 機能を抑制しても α SYN 分泌は抑制されず、むしろ増大することが確認している⁶³⁾。これらの事実は、 α SYN 分泌におけるエキソソームの関与は少ないことを示唆している⁶³⁾。

どのような経路をとるにせよ、細胞外へ分泌された α SYNは隣接細胞により取り込まれ凝集化を生じることが事実である。先に述べた通り α SYNオリゴマーの取り込みにはエンドサイトーシスが重要と考えられており、今回の検討においてもエンドサイトーシスの実行分子であるdynamin 1機能破綻により、細胞内へ移行する α SYNは著しく減少することが確認された。エンドサイトーシス阻害剤であるmonodansylcadaverineやdynasoreは α SYN取り込みを減少させることが知られていたが²²⁾、本研究ではdynamin GTPase阻害作用のあるsertralineが強力に神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系への α SYN取り込みを抑えることを証明した(図 14)。今回実験に用いたsertralineの量は10 μ M (=3 μ g/ml相当)であり、これは抗うつ薬としての治療量(100-200 mg/day)を経口服用した場合に髄液や脳実質に移行する濃度(2 μ g/ml前後)と同等であると推定される⁶⁸⁾。PD患者にはうつ、アパシー、不安といった非運動症状が多いことが知られており⁶⁹⁾⁷⁰⁾、臨床現場においてもsertralineを含めたSSRIはPD関連うつ症状に対する第一選択薬として汎用されている⁷¹⁾。抗うつ薬sertralineに α SYN病理進展を抑制する可能性を示した今回の研究は、既存薬の新たな薬理作用の可能性を示したという点で大きなインパクトを有しているといえるであろう。本研究で行った共培養実験では、dynamin GTPase阻害作用のあるsertraline処理下で α SYN陽性アクセプター細胞の頻度は神経モデル細胞・オリゴデンドログリアモデル細胞両方で減少した。この結果より、 α SYNの細胞内取り込みに関する機構としては、クラスリン依存性エンドサイトーシスが関与していると考え得るが他に、エキソソーム小胞を介する機構、形質膜の貫通などの可能性もあると推定される。さらに、これら以外の機構としてtunneling nanotubesも挙げられる。tunneling nanotubesとは、様々な細胞株でその存在が観察されている細長く伸びた細胞膜のチューブ構造であり、遠隔にある2つの細胞を物理的に連結してカルシウムシグナルなどの細胞

内シグナルを伝えたり、遠隔の細胞間でタンパク質を素早く確実にやりとりして情報交換を可能にしている³²⁾。

最近第一世代のSSRIであるfluoxetineの投与により、MSAマウスモデルの運動症状および病理変化が改善されたとの報告があった⁷²⁾。同論文の著者らはfluoxetineがGDNF (grail derived neurotrophic factor)発現量を増大させる、あるいはsurviving signalであるERK系の活性化を生じることによって神経保護的に働くのではないかと推論している。しかし、我々の研究結果を考慮すると、SSRIであるfluoxetineがdynamin機能を阻害し、 α SYNの細胞間伝播を抑制させた結果と考えることも可能かもしれない。臨床研究についてはSSRI同様dynamin GTPase阻害作用のある三環系抗うつ薬についても、PDの進行抑制効果があるとの報告がある⁴³⁾⁷³⁾。またドイツのグループはプラセボ薬との比較においてSSRIのparoxetineがMSA患者の運動および構音障害を有意に改善させたという結果を報告している⁷⁴⁾。さらに最近フランスを中心とした欧州の医療機関において、MSA患者を対象にfluoxetineの多施設2重盲検試験も実施されており、その結果が待たれるところである⁷⁵⁾。

結語

本研究では細胞外 α SYN が神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系に取り込まれ、オリゴマー化の後に細胞内封入体を形成することを確認した。また、これらの細胞における α SYN 取り込みはエンドサイトーシスの実行分子であるdynamin 機能に依存していることを多角的に証明した。さらに、dynamin GTPase の薬理的阻害作用を有する sertraline が α SYN のモデル細胞間伝播を抑制することを見いだした。PD 患者脳における神経細胞の変性脱落は十数年以上に渡り

緩和に進行することから、発症早期に dynamin 機能を抑制する sertraline の服用を開始することにより、周辺細胞への α SYN 病変拡大が抑えられ症状進行を遅らせることが期待出来る可能性がある (図 15)。細胞間異常タンパク伝播は神経変性疾患に共通してみられる病態メカニズムとの考えもあり、このメカニズムの解明は、これらの疾患に共通した治療ターゲットとなる可能性がある。今後異常凝集タンパクの吸収・分解・分泌に関与する細胞内分子機構をさらに詳細に解明し、神経変性疾患の進行阻止を目指した治療介入法を確立したい。

追記

本研究内容は以下の科学雑誌に掲載された⁷⁶⁾。

Konno M, Hasegawa T, Baba T, Miura E, Sugeno N, Kikuchi A, Fiesel FC, Sasaki T, Aoki M, Itoyama Y and Takeda A. Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 38.

長谷川隆文、今野昌俊、菅野直人、三浦永美子、菊池昭夫、馬場徹、青木正志、武田篤-第 17 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム Excellent Poster Award-神経・オリゴデンドログリア細胞への α シヌクレイン取り込みはダイナミン GTPase 活性阻害により抑制される東北医学雑誌 125: 186-188, 2013

謝辞

本研究にあたりご指導、ご協力頂きました以下の先生方に深謝致します。

東北大学大学院医学系研究科神経感覚器病態学講座神経内科学分野

長谷川隆文先生 には研究立案、実験手技の指導、研究結果の解釈、論文執筆など本研究全体を通じご指導を頂きました。

菅野直人先生、馬場徹先生、菊池昭夫先生、三浦永美子先生 には培養細胞実験や試薬調整の一部をご協力頂きました。

武田篤先生 には研究結果の解釈および研究論文執筆に際し有益なアドバイスを頂きました。

糸山泰人先生、青木正志先生 には研究全般に渡りご助言頂きました。

大阪大学大学院医学系研究科神経内科学分野

佐々木勉先生 には MO3.13 細胞をご提供頂きました。

聖マリアンナ医科大学医学部医学科微生物学教室

三好洋先生 にはヒト野生型および K44A 変異型 dynamin 1 発現ベクターをご提供頂きました。

Department of Neurodegeneration, Hertie-Institute for Clinical Brain Research,
University of Tübingen, Germany

Fabienne C Fiesel 先生 には mCherry- α SYN 発現ベクターをご提供頂きました。

文献

1. Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, Kikuchi A, Akita H, Perry G, Smith MA, Itoyama Y: Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res* 2004, 1013:51–59.
2. Sugeno N, Takeda A, Hasegawa T, Kobayashi M, Kikuchi A, Mori F, Wakabayashi K, Itoyama Y: Serine 129 phosphorylation of alpha –synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J Biol Chem* 2008, 283:23179–23188.
3. Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T: Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 1998, 152:879–884.
4. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997, 388:839–840.
5. Wakabayashi K, Matsumoto K, Takayama K, Yoshimoto M, Takahashi H: NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1997, 239:45–48.
6. Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, Takahashi H: Accumulation of alpha-synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 1998, 96:445–452.
7. Furukawa K, Matsuzaki-Kobayashi M, Hasegawa T, Kikuchi A, Sugeno N, Itoyama Y, Wang Y, Yao PJ, Bushlin I, Takeda A: Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *J Neurochem* 2006, 97:1071–1077.

8. Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Takeda A, Sugeno N, Kikuchi A, Furukawa K, Perry G, Smith MA, Itoyama Y: Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2006, 580:2147–2152.
9. Kahle PJ: Alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008, 115:87–95.
10. Takeda A, Hasegawa T, Matsuzaki-Kobayashi M, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, Furukawa K: Mechanisms of neuronal death in synucleinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2006, 2006:19365.
11. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T: The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 1995, 14:467–475.
12. Clayton DF, George JM: The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998, 21:249–254.
13. Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P: Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 2010, 9:1128–1138.
14. Lee SJ, Desplats P, Sigurdson C, Tsigelny I, Masliah E: Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. *Nat Rev Neurol* 2010, 6:702–706.
15. Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M: The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2010, 33:317–325.
16. Brundin P, Melki R, Kopito R: Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11:301–307.
17. Frost B, Diamond MI: Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases.

Nat Rev Neurosci 2010, 11:155–159.

18. Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC: Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2001, 276:27441–27448.

19. Lee SJ: Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2008, 34:17–22.

20. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM: Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 2011, 72:57–71.

21. Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E, Lee SJ: Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem* 2010, 285:9262–9272.

22. Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, Outeiro TF, Melki R, Kallunki P, Fog K, Li JY, Brundin P: Alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 2011, 121:715–725.

23. Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ: Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:13010–13015.

24. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW: Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 2008, 14:504–506.

25. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP,

- Rehncrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P: Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008, 14:501–503.
26. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Olanow CW, Freeman TB: Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second casereport. *Mov Disord* 2008, 23:2303–2306.
27. Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H: Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1998, 249:180–182.
28. Miller DW, Johnson JM, Solano SM, Hollingsworth ZR, Standaert DG, Young AB: Absence of alpha-synuclein mRNA expression in normal and multiple system atrophy oligodendroglia. *J Neural Transm* 2005, 112:1613–1624.
29. Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y: In vivo visualization of alphasynuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazolepositron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 2010, 133:1772–1778.
30. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E: Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003, 24:197–211.
31. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM: Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alphasynuclein release

and transmission. *Neurobiol Dis* 2011, 42:360–367.

32. Abounit S, Zurzolo C: Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci.* 2012 Mar 1;125(Pt 5):1089-98.

33. Takahashi K, Miyoshi H, Otomo M, Osada K, Yamaguchi N, Nakashima H: Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391:382–387.

34. Da Silva JS, Hasegawa T, Miyagi T, Dotti CG, Abad-Rodriguez J: Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci* 2005, 8:606–615.

35. Miyake E: Establishment of a human oligodendroglial cell line. *Acta Neuropathol* 1979, 46:51–55.

36. Uezono Y, Nakamura E, Ueda Y, Shibuya I, Ueta Y, Yokoo H, Yanagita T, Toyohira Y, Kobayashi H, Yanagihara N, Wada A: Production of cAMP by Adrenomedullin in human oligodendroglial cell line KG1C: comparison with calcitonin gene-related peptide and amylin. *Brain Res Mol Brain Res* 2001, 97:59–69.

37. Hasegawa T, Baba T, Kobayashi M, Konno M, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, Takeda A: Role of TPPP/p25 on alpha-synuclein-mediated oligodendroglial degeneration and the protective effect of SIRT2inhibition in a cellular model of multiple system atrophy. *Neurochem Int* 2010, 57:857–866.

38. Cookson MR: Alpha-Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 2009, 4:9.

39. Kovacs GG, Laszlo L, Kovacs J, Jensen PH, Lindersson E, Botond G, Molnar T, Perczel A, Hudecz F, Mezo G, et al: Natively unfolded tubulin polymerization promoting protein TPPP/p25 is a common marker of alpha-synucleinopathies.

Neurobiol Dis 2004, 17:155–162.

40. Orosz F, Kovacs GG, Lehotzky A, Olah J, Vincze O, Ovadi J: TPPP/p25: from unfolded protein to misfolding disease: prediction and experiments. *Biol Cell* 2004, 96:701–711.

41. Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG: Dynamin and betaarrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 1996, 271:18302–18305.

42. Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ: Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J BiochemCell Biol* 2008, 40:1835–1849.

43. Otomo M, Takahashi K, Miyoshi H, Osada K, Nakashima H, Yamaguchi N: Some selective serotonin reuptake inhibitors inhibit dynamin Iguanosine triphosphatase (GTPase). *Biol Pharm Bull* 2008, 31:1489–1495.

44. Raimondi A, Ferguson SM, Lou X, Armbruster M, Paradise S, Giovedi S, Messa M, Kono N, Takasaki J, Cappello V, O'Toole E, Ryan TA, De Camilli P: Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 2011, 70:1100–1114.

45. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM: Stabilization of alphasynuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998, 273:9443–9449.

46. Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van Der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretschmar HA, Haass C: Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* 2000,

20:6365–6373.

47. Dixon C, Mathias N, Zweig RM, Davis DA, Gross DS: Alpha-synuclein targets the plasma membrane via the secretory pathway and induces toxicity in yeast. *Genetics* 2005, 170:47–59.

48. Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM: Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 2010, 75:1766–1772.

49. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D: Detection of oligomeric forms of alphasynuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 2006, 20:419–425.

50. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, Schapira AH: Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Arch Neurol* 2010, 67:1464–1472.

51. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D: Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004, 305:1292–1295.

52. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L: Wild type a-synuclein is degraded by chaperone mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008, 283:23542–23556.

53. Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA: Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem* 2010, 285:13621–13629.

54. Wenning GK, Stefanova N, Jellinger KA, Poewe W, Schlossmacher MG: Multiple system atrophy: a primary oligodendrogliaopathy. *Ann Neurol* 2008, 64:239–246.
55. Ubhi K, Low P, Masliah E: Multiple system atrophy: a clinical and neuropathological perspective. *Trends Neurosci* 2011, 34:581–590.
56. Ahmed Z, Asi YT, Sailer A, Lees AJ, Houlden H, Revesz T, Holton JL: Review: The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012, 38:4–24.
57. Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I: Expression of the endocytosis regulatory proteins Rab5 and Rabaptin-5 in glial cytoplasmic inclusions from brains with multiple system atrophy. *Clin Neuropathol* 2000, 19:51–56.
58. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M: Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010, 285:34885–34898.
59. Angot E, Brundin P: Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009, 15(Suppl 3):S143–S147.
60. Bhak G, Choe YJ, Paik SR: Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation. *BMB Rep* 2009, 42:541–551.
61. Lee HJ, Patel S, Lee SJ: Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 2005, 25:6016–6024.
62. Flower TR, Clark-Dixon C, Metoyer C, Yang H, Shi R, Zhang Z, Witt SN: YGR198w (YPP1) targets A30P alpha-synuclein to the vacuole for degradation. *J Cell Biol* 2007, 177:1091–1104.

63. Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A: The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. *PLoSOne* 2011, 6:e29460.
64. Liu J, Zhang JP, Shi M, Quinn T, Bradner J, Beyer R, Chen S, Zhang J: Rab11a and HSP90 regulate recycling of extracellular alpha-synuclein. *J Neurosci* 2009, 29:1480–1485.
65. Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF: Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 2007, 211:582–590.
66. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G: Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:9683–9688.
67. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K: Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 2010, 30:6838–6851.
68. Lass-Flörl C, Dierich MP, Fuchs D, Semenitz E, Jenewein I, Ledochowski M: Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. *J Antimicrob Chemother* 2001, 48:775–779.
69. Baba T, Takeda A, Kikuchi A, Nishio Y, Hosokai Y, Hirayama K, Hasegawa T, Sugeno N, Suzuki K, Mori E, Mori E, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y: Association of olfactory dysfunction and brain. *Metabolism in Parkinson's disease. Mov Disord* 2011, 26:621–628.

70. Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, Nishio Y, Hosokai Y, Kanno S, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Suzuki K, Takahashi S, Fukuda H, Aoki M, Itoyama Y, Mori E, Takeda A: Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain* 2012, 135:161–169.
71. Marino S, Sessa E, Di Lorenzo G, Digangi G, Alagna A, Bramanti P, Di Bella P: Sertraline in the treatment of depressive disorders in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2008, 29:391–395.
72. Ubhi K, Inglis C, Mante M, Patrick C, Adame A, Spencer B, Rockenstein E, May V, Winkler J, Masliah E: Fluoxetine ameliorates behavioral and neuropathological deficits in a transgenic model mouse of alphasynucleinopathy. *Exp Neurol* 2012, 234:405–416.
73. Paumier KL, Siderowf AD, Auinger P, Oakes D, Madhavan L, Espay AJ, Revilla FJ, Collier TJ: Tricyclic antidepressants delay the need for dopaminergic therapy in early Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012, 27:880–887.
74. Ozawa T, Sekiya K, Sekine Y, Shimohata T, Tomita M, Nakayama H, Aizawa N, Takeuchi R, Tokutake T, Katada S, Nishizawa M: Maintaining glottic opening in multiple system atrophy: Efficacy of serotonergic therapy. *Mov Disord* 2012, 27:919–921.
75. Flabeau O, Meissner WG, Tison F: Multiple system atrophy: current and future approaches to management. *Ther Adv Neurol Disord* 2010, 3:249–263.
76. Konno M, Hasegawa T, Baba T, Miura E, Sugeno N, Kikuchi A, Fiesel FC, Sasaki T, Aoki M, Itoyama Y and Takeda A. Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener.* 2012; 7: 38.

Figure の説明

Figure 1 α SYN は神経・オリゴデンドログリア細胞内に異常蓄積し、その結果封入体が認められる

α SYN が異常蓄積した結果、PD においては神経細胞内に認められるレビー小体、MSA においてはオリゴデンドログリア内に認められるグリア細胞内封入体 (GCI) が出現する。

Figure 2 ヒト α SYN の構造

ヒト α SYN は 140 アミノ酸からなる機能不明のタンパクでシナプス前末端に豊富に存在し、構造的には KTKEVG のアミノ酸モチーフの繰り返し配列をもち、両親媒性の N 末ドメイン、中央部の疎水性 NAC (non-A β component of AD amyloid) ドメイン、および陰性に荷電し金属類に結合性を示す C 末ドメインから構成される。A30P、A53T のような点変異により家族性パーキンソン病が発症することが知られている。

Figure 3 正常、病的状況下における α SYN の構造変化

Native な状態の α SYN は α ヘリックス構造をとり生体膜に結合するか、あるいは不定の構造をとり細胞質に存在しているが、A30P、A53T のような点変異、酸化ストレスなどにより線維・凝集化を生じることが知られている。 α SYN はフィブリル形成に至る線維化の過程の中で α ヘリックス構造と β シート構造を種々の割合で併せ持つ様々な中間体を生じるが、成熟したフィブリルよりもプロトフィブリルとよばれる可溶性中間体に強い細胞毒性が認められる。

Figure 4 Braak らの提唱する PD 患者脳における α SYN 病理の topographic progression (いわゆるレビー病理脳幹上行仮説)

レビー病理脳幹上行仮説は α SYN の凝集、沈着を指標に PD の中枢病理進展を模式化することを試みた PD 病理進展仮説である。その仮説によれば、PD の病理は迷走神経背側核から始まり、その後に青斑核を含む橋被蓋へ進展、PD の運動症状の発現の主な責任病巣と考えられる黒質障害はその後のステージ 3 以降になってはじめて生じ、次いで病理進展は脳に至るとされる。

Figure 5 α SYN の取り込み経路

α SYN の細胞内取り込みに関する機構としては、エンドサイトーシス、エキソソーム小胞を介する機構、形質膜の貫通、および細胞膜ナノチューブなどが報告されている。

Figure 6 α SYN は神経・オリゴデンドログリアモデル細胞に取り込まれオリゴマーを形成する

A : 組み換えヒト α SYN タンパク大量精製の結果。(a) GST- α SYN および GST タグ切断・精製後の α SYN を SDS-PAGE に供し CBB 染色および抗 synuclein-1 抗体を用いたイムノブロットにて結果を評価した結果を示す。IPTG 誘導下に発現した GST- α SYN 融合タンパクは 44 kDa に認められ、GST タグ切断にて、 α SYN モノマーに相当する 18 kDa 付近にバンドが検出された (*asterisk*)。抗 GST 抗体を用いたブロットでは GST タグの切断後のサンプルには GST 陽性バンドは検出されなかった。(b) Native PAGE では大部分の α SYN は 3 量体に相当する 54 kDa に検出された。(c) 得られたリコンビナント α SYN を細胞培地中にて 24 時間 37°C

下で incubate しても凝集傾向は示さなかった。B : 5 μ M α SYN を含む培地で(a) SH-SY5Y 神経モデル細胞、(b) KG1C オリゴデンドログリアモデル細胞を一定時間培養後、疎水性画分と親水性画分に分け細胞内に取り込まれた α SYN を抗 synuclein-1 抗体によるイムノブロットにて検出した。 α SYN 添加 1 分後には親水性画分にて α SYN モノマーが検出され、以後経時的に増加した。同様に SDS 抵抗性の 2-3 量体 α SYN の出現・増加も確認された。疎水性・親水性分画の分離については、細胞質マーカーである Hsp90、形質膜マーカーである Na⁺/K⁺ ATPase の発現により確認した。(c) 0-10 μ M α SYN を含む培地にて SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養したところ、親水性画分において培地中の α SYN 濃度依存的に α SYN モノマー・オリゴマーの増加が認められた。(d) (c)のブロットを CST 社の α SYN 抗体で再ブロットした場合も、同様の結果が得られた。*asterisk* は抗 synuclein-1 抗体使用時にみられる非特異的バンドを示す。

Figure 7 α SYN モノマー量のデンストメトリーによる定量結果および凝集化 GST- α SYN 多量体は、親水性画にて検出される

細胞内に出現した α SYN モノマー量のデンストメトリーによる定量結果を示す。A : α SYN 曝露後に SH-SY5Y ((a), (c))および KG1C 細胞 (b) の親水性画分に現れた α SYN モノマー量を示す。数値は α SYN バンド輝度を Hsp90 バンド輝度にて除算したものを示した。B : SH-SY5Y 細胞を 5 μ M GST- α SYN にて曝露した結果を示す。抗 GST 抗体で認識される凝集化 GST- α SYN 多量体を親水性画分にて検出した。

Figure 8 シヌクレインファミリー分子において、 α SYN のみが選択的に神経モデル細胞内へ取り込まれる

SH-SY5Y 神経モデル細胞を 5 μ M の α 、 β 、 γ SYN とそれぞれ 24 時間曝露させると、 α SYN のみがほぼ選択的に細胞内へ取り込まれた。また野生型 α SYN と比較し、A30P・A53T 家族性 PD 関連変異型 α SYN は、細胞内へ取り込まれた後より顕著な α SYN 多量体形成をもたらした。

Figure 9 α SYN 曝露により神経・オリゴデンドログリアモデル細胞内に細胞質封入体が形成される

A : 5 μ M α SYN を 24 時間培地に添加したところ、(a) SH-SY5Y 神経モデル細胞・(b) KG1C オリゴデンドログリアモデル細胞の細胞質内に α SYN 陽性の顆粒状の凝集物に加え、核近傍に大型の封入体出現が認められた。いずれの構造物もユビキチンおよびチオフラビン S 陽性であった。大型の封入体のみが Ser129 α SYN 陽性であった。B : (a) SH-SY5Y 細胞、(b) KG1C 細胞とも核近傍にある α SYN 陽性封入体はレビー小体のマーカーである γ -tubulin、peripherin、および vimentin と共局在を示した。KG1C の α SYN 陽性の封入体は、TPPP/p25 α と共存していた。C : ラット primary cortical neuron を用いた同様の実験においても α SYN 陽性封入体が認められた。D : SH-SY5Y、KG1C 細胞における核近傍の α SYN 陽性封入体を有する細胞の割合を示す。封入体陽性細胞の割合は時間と共に増加し、 α SYN 曝露 24 時間後にはそれぞれ 35%、24%であった。size bar は 10.0 μ m を示す。

Figure 10 リソソーム機能阻害により α SYN オリゴマー形成は増大する

A : SH-SY5Y・KG1C 細胞に取り込まれた α SYN の subcellular distribution について免疫染色法による検討を行った結果を示す。 α SYN 陽性封入体の一部は、初期エンドゾームマーカー (Rab5A)およびリソソームマーカー (Lamp-1)と共存して

いた。B : bafilomycin A1 (0-5 nM)にて 24 時間処理した SH-SY5Y 細胞を、5 μ M α SYN 存在下でさらに 24 時間培養を行い、 α SYN 細胞内蓄積への影響を検討した結果を示す。未処理のコントロールと比べ bafilomycin A1 処理群では親水性画分における高分子 α SYN オリゴマー蓄積が認められた。*asterisk* は抗 synuclein-1 抗体使用時にみられる非特異的バンドを示す。C : bafilomycin A1 添加後には LC3-II の増加を認めたが、caspase-3 cleavage は検出されなかった。

Figure 11 クラスリン依存性エンドサイトーシスは dynamin 分子により実行される

クラスリン依存性エンドサイトーシスでは、まず細胞膜が分子を認識した情報をもとに細胞表面がくぼみ、分子を包み込むように細胞内に陥入しクラスリン被覆小胞 (clathrin coated vesicle) が形成される。次に、クラスリン被覆小胞の頸部の箇所 dynamin 分子が巻きつき、GTP 加水分解 (GTP hydrolysis) 活性が働き、細胞内に取り込まれる。

Figure 12 α SYN の細胞内取り込みは dynamin 阻害により抑制される

A : 神経・オリゴデンドログリアモデル細胞における dynamin 分子の発現プロフィールを示す。dynamin 2 は神経、オリゴデンドログリア系モデル細胞両者に広く発現する一方、dynamin 1 は SH-SY5Y・PC12 ドパミン神経モデル細胞により強く発現していた。DDC および TPPP/p25 はそれぞれドパミン神経およびオリゴデンドログリアのマーカー分子である。loading control には α -tubulin を用いた。

B : (a) SH-SY5Y 細胞および(b) KG1C 細胞を sertraline (0-10 μ M) で 30 分間前処理後、5 μ M α SYN に曝露し細胞内移行について確認した結果を示す。何れの細胞株においても sertraline は濃度依存的に α SYN の取り込みを有意に減少させた。

コントロール細胞は solvent (0.1% DMSO)のみで処理し、親水性・疎水性画分の分離はそれぞれ Hsp90、Na⁺/K⁺ ATPase 発現により確認した。C : SH-SY5Y 細胞にて (c) K44A DN 変異型 dynamin 1 あるいは(d) dynamin 1 特異的 siRNA で同分子の機能を抑制すると、コントロール細胞と比べ α SYN の細胞内取り込みが著しく抑制された。これに反して野生型 dynamin 1 の過剰発現では細胞内の SDS 不溶性 α SYN オリゴマーはコントロール細胞に比べ増加していた。dynamin 1 の発現操作は内因性 α SYN 量には変化を生じなかった。

Figure 13 Sertraline は α SYN の細胞間伝播を抑制する

A : 神経-神経・神経-オリゴデンドログリアモデル細胞による共培養系を用い α SYN 細胞間伝播を確認した結果を示す。 α SYN 分泌を担うドナー細胞として mCherry- α SYN を発現する SH-SY5Y 細胞を、培地中の α SYN を取り込むアクセプター細胞として、EGFP を発現する PC12 ドパミン神経モデル細胞または MO3.13 オリゴデンドログリアモデル細胞をそれぞれ準備した。sertraline (10 μ M) 存在・非存在下条件においてドナー・アクセプター細胞を共培養し、72 時間後に赤色蛍光標識された α SYN のドナーからアクセプター細胞への移動を、共焦点レーザー顕微鏡下に観察した。size bar は 10.0 μ m を示す。B : ドナーに mCherry- α SYN を使用した共培養では、mCherry- α SYN を有するアクセプター細胞の出現頻度は PC12 で 4.2%、MO13.3 で 3.8%であった。一方、コントロールとして mCherry のみを過剰発現したドナー細胞を用いた場合の封入体陽性アクセプター細胞の頻度は、両者とも 0.2%以下であった (A, B)。次に sertraline 添加培地で同様の実験を行ったところ、アクセプター細胞に取り込まれた mCherry- α SYN の量は有意に減少した (* p <0.05)。C : sertraline はドナー細胞が培地中に分泌する mCherry- α SYN 量に影響を与えなかった。BSA および Hsp90 は

それぞれ培地と細胞質マーカーとして使用した。

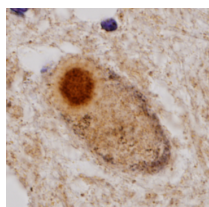
Figure 14 α SYN の細胞内取り込みの経路としてクラスリン依存性エンドサイトーシスが関与している

エンドサイトーシスの実行分子である dynamin 1 機能破綻により、細胞内へ移行する α SYN は著しく減少する。エンドサイトーシス阻害剤であり dynamin GTPase 阻害作用のある sertraline が強力に神経・オリゴデンドログリアモデル細胞系への α SYN 取り込みを抑える。また、エキソソーム形成に必須である AAA 型 ATPase VPS4 機能を抑制しても α SYN 分泌は抑制されず、むしろ増大する。この事実は、 α SYN 分泌におけるエキソソームの関与は少ないことを示唆している。

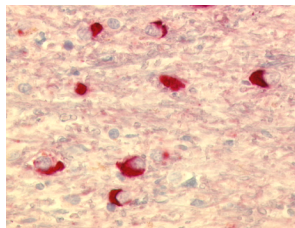
Figure 15 sertraline は PD の症状進行を遅らせる可能性がある

PD 患者脳における神経細胞の変性脱落は十数年以上に渡り緩徐に進行することから、発症早期に dynamin 機能を抑制する sertraline の服用を開始することにより、周辺細胞への α SYN 病変拡大が抑えられ症状進行を遅らせることが期待出来る可能性がある。

Figure 1



レビー小体



グリア細胞内封入体

Figure 2

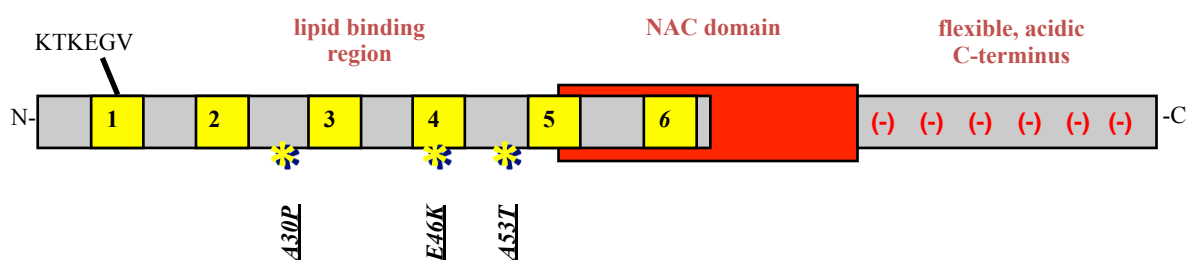


Figure 3

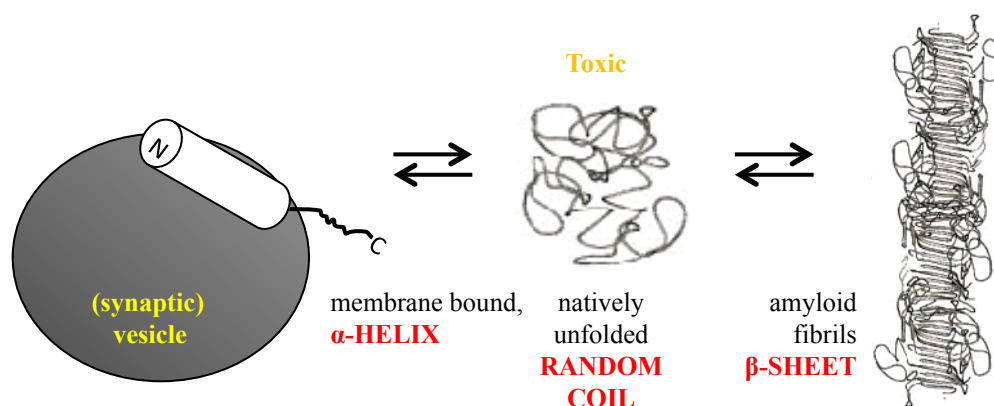


Figure 4

Braak 仮説

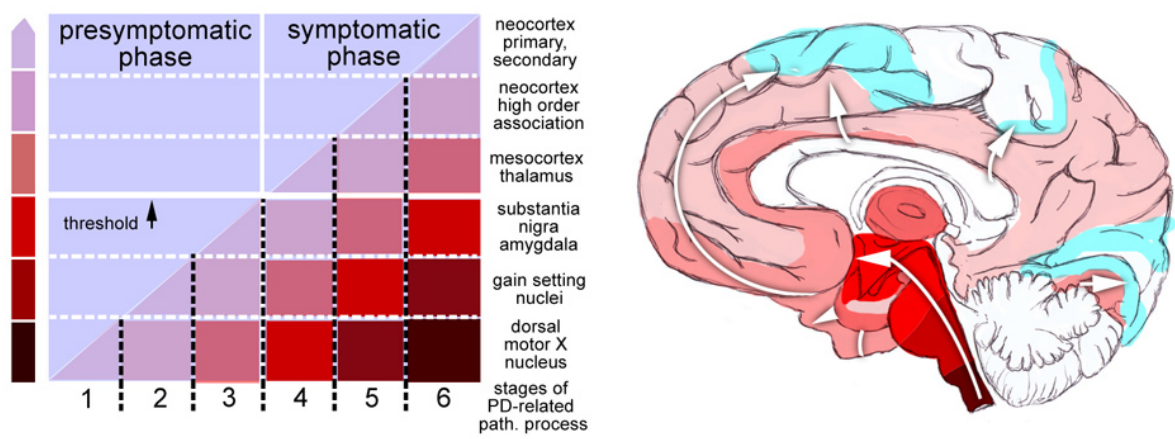


Figure 5

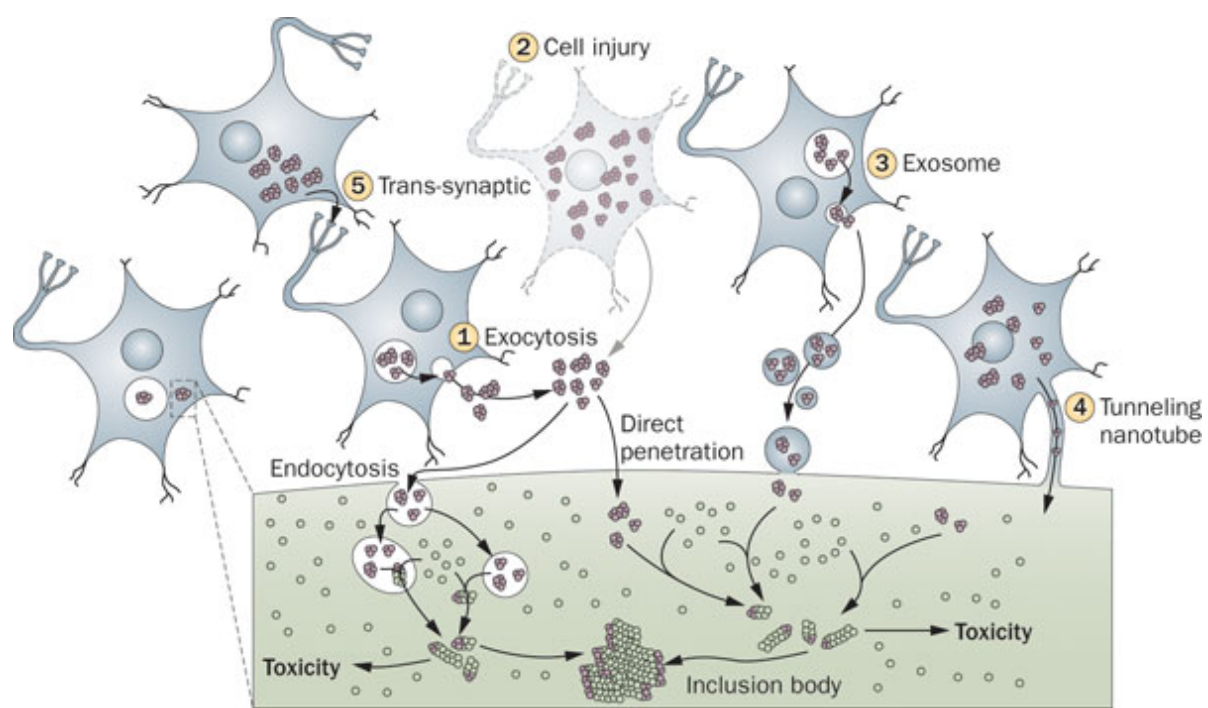


Figure 6

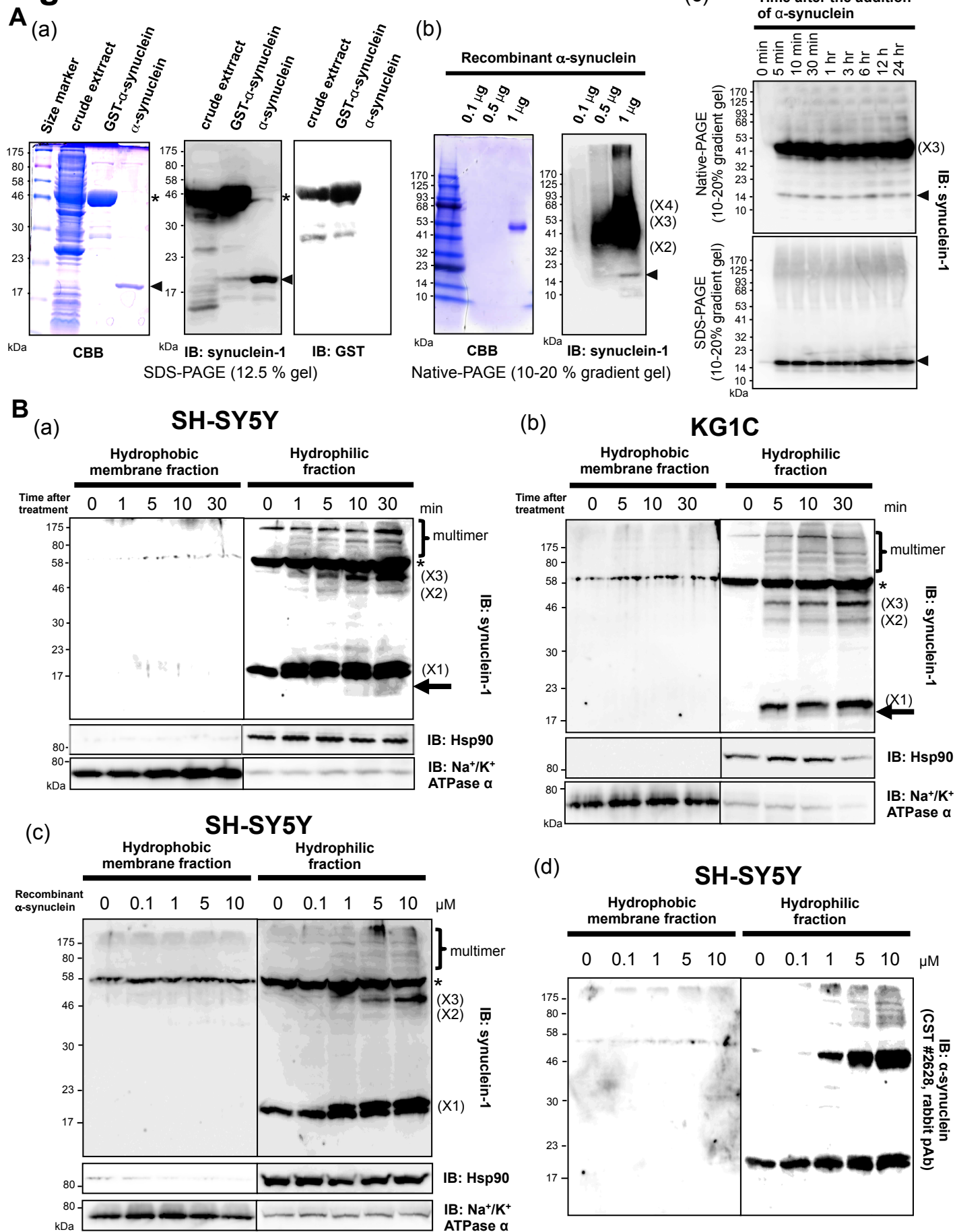


Figure 7

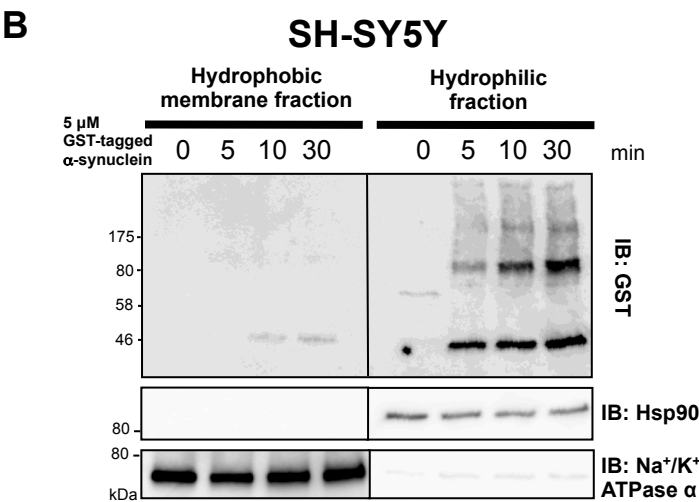
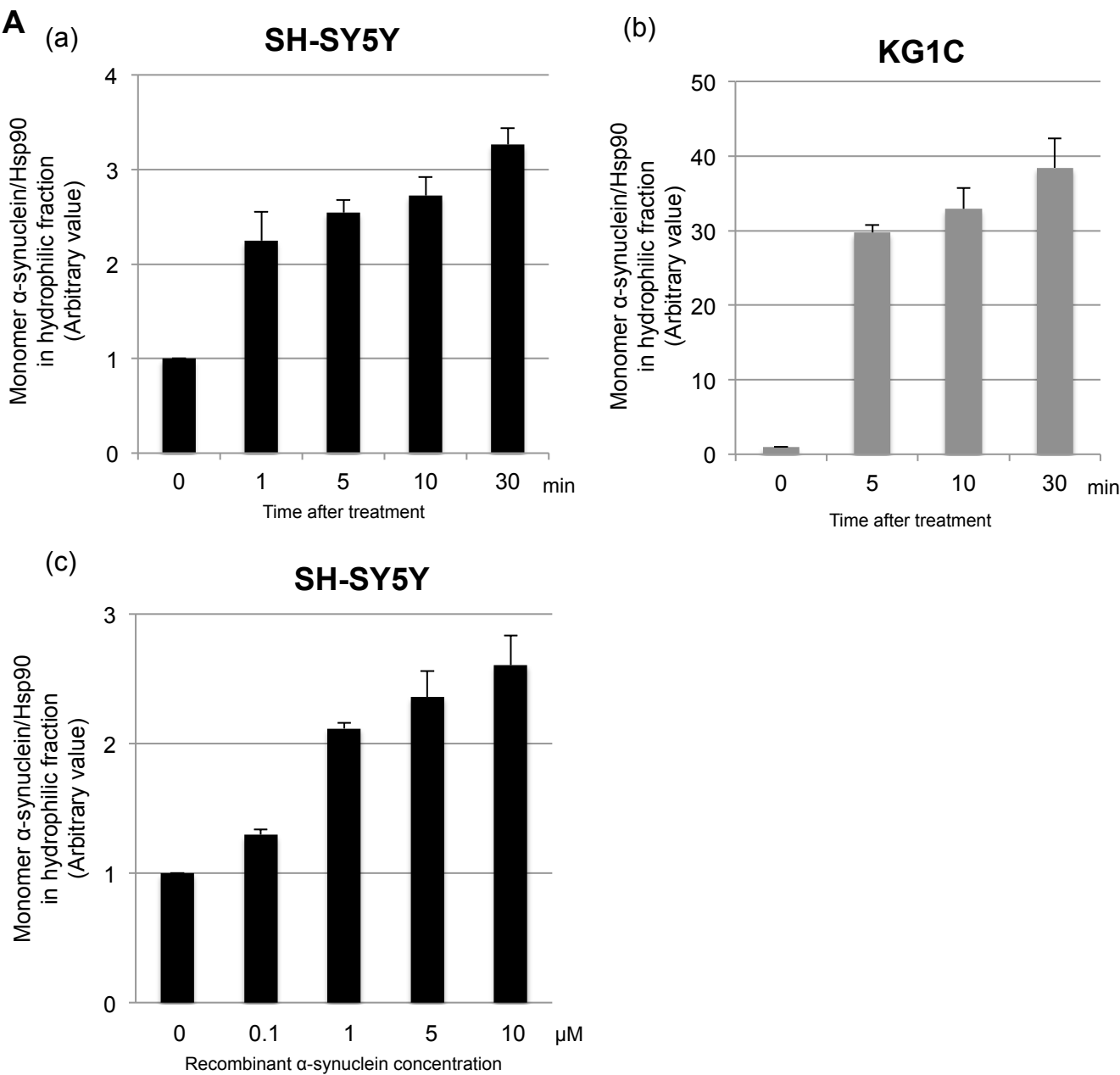


Figure 8

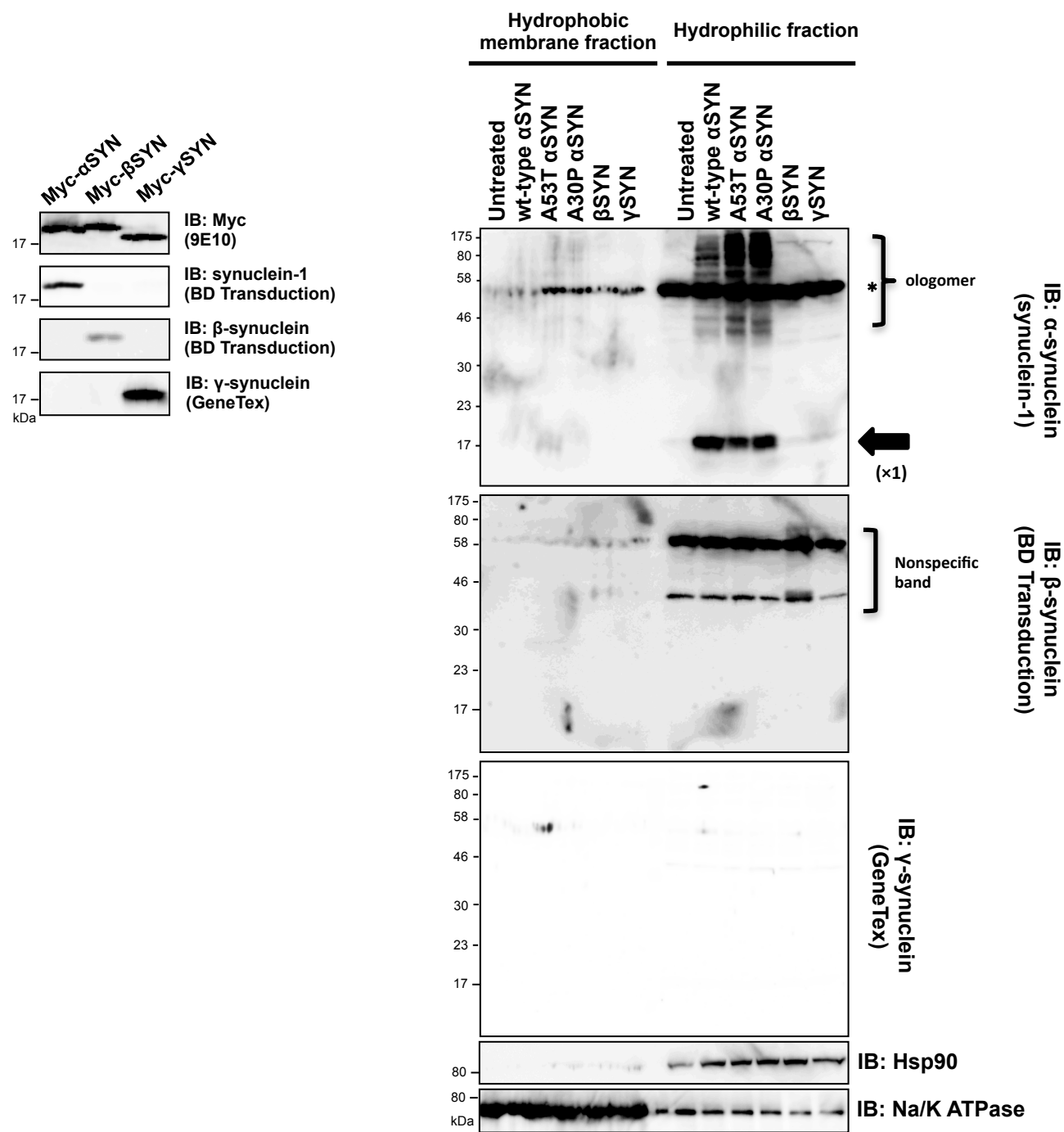


Figure 9

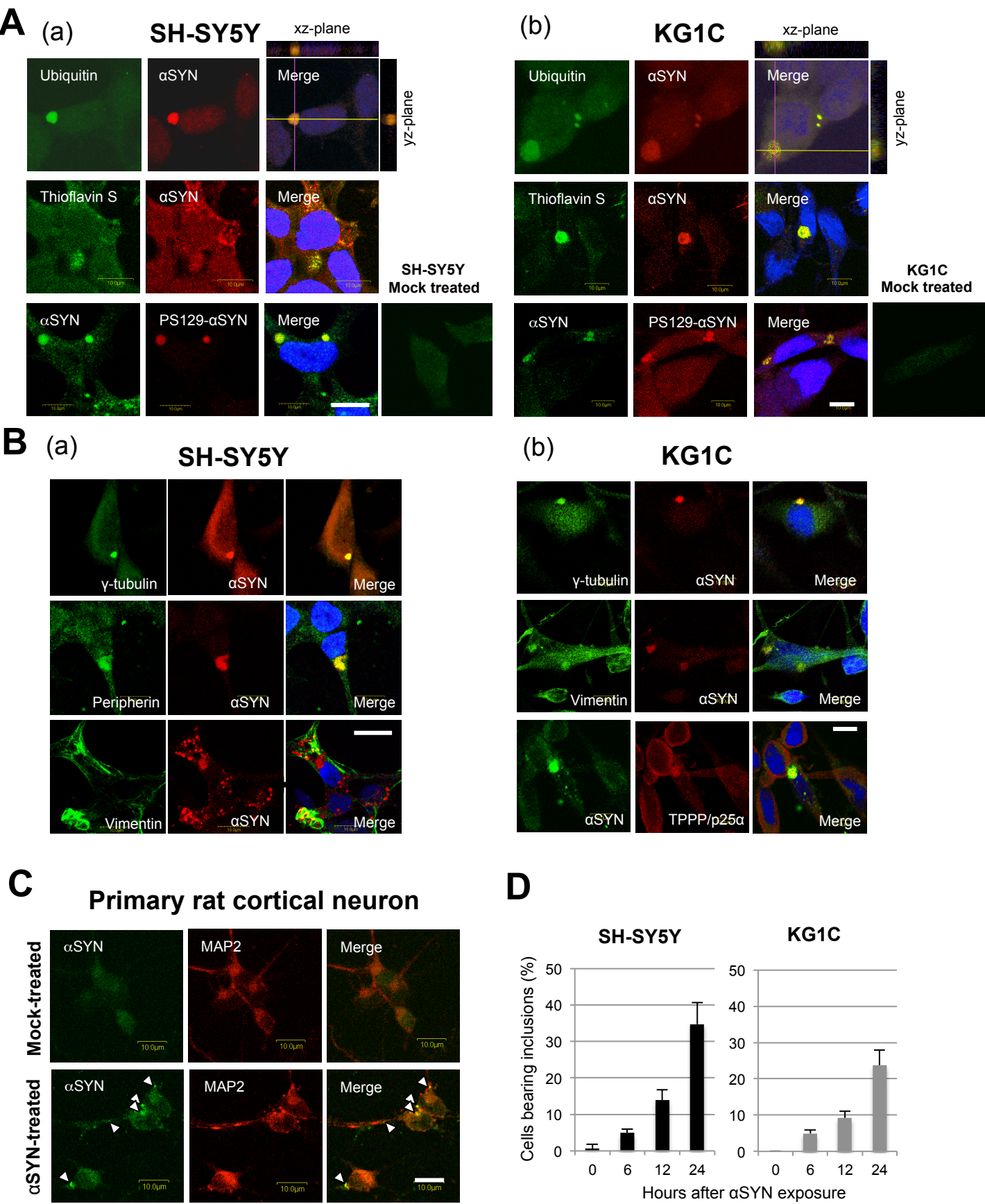
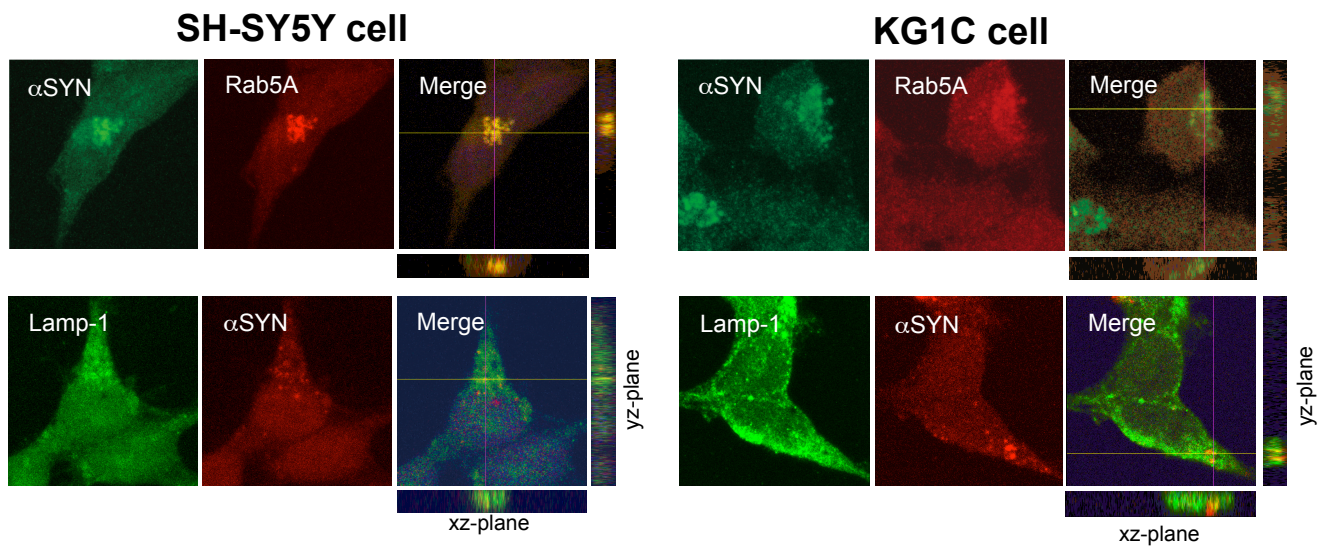
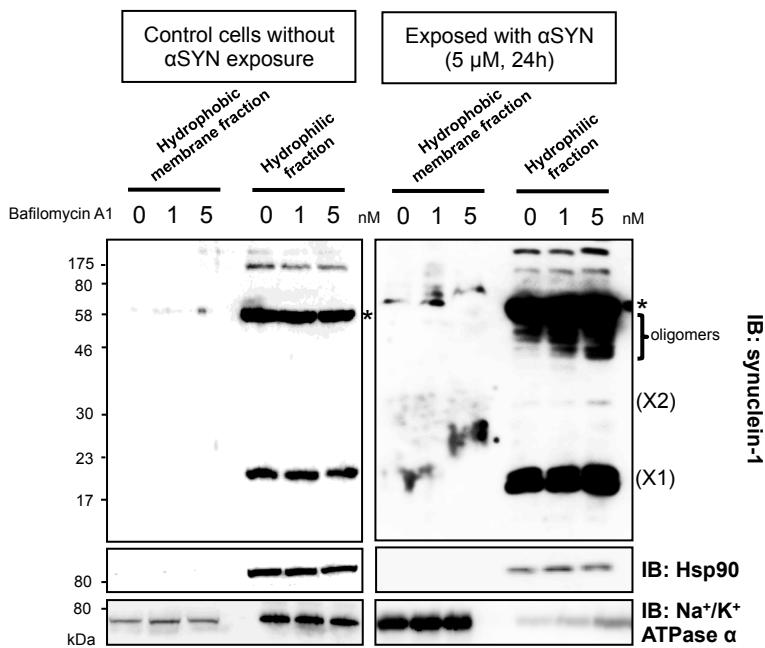


Figure 10

A



B



C

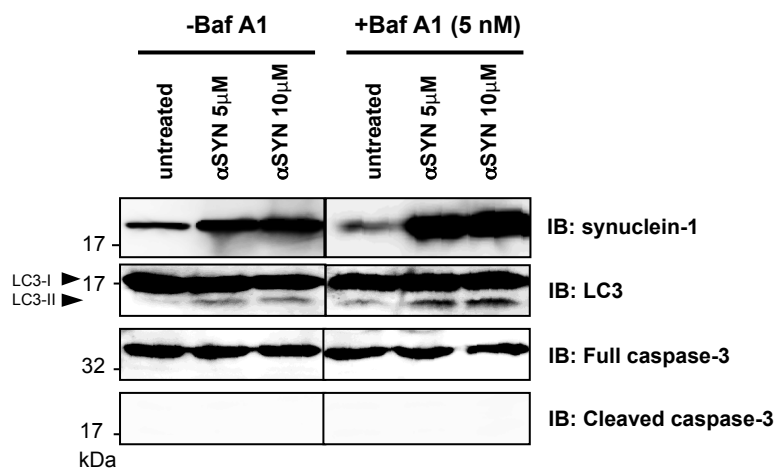


Figure 11

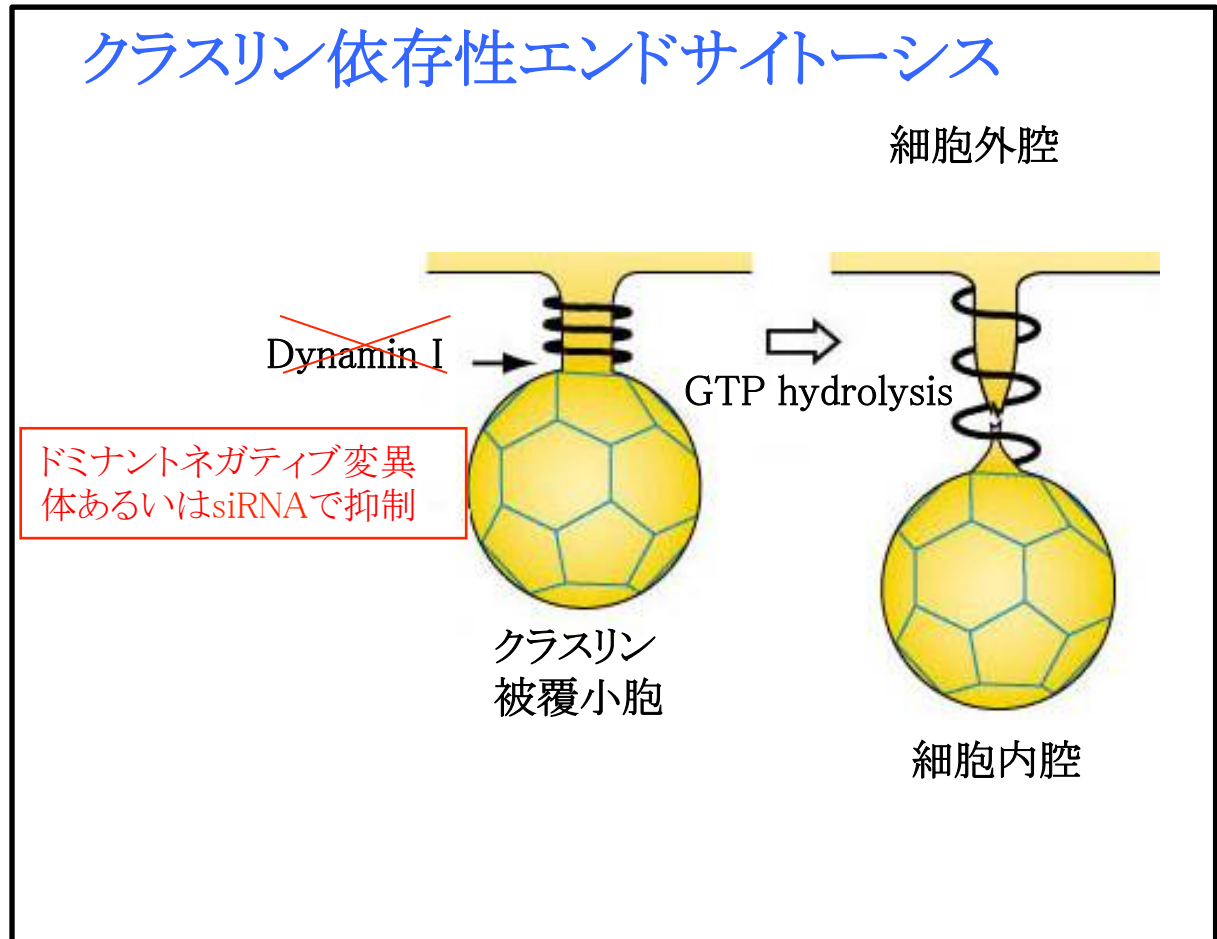
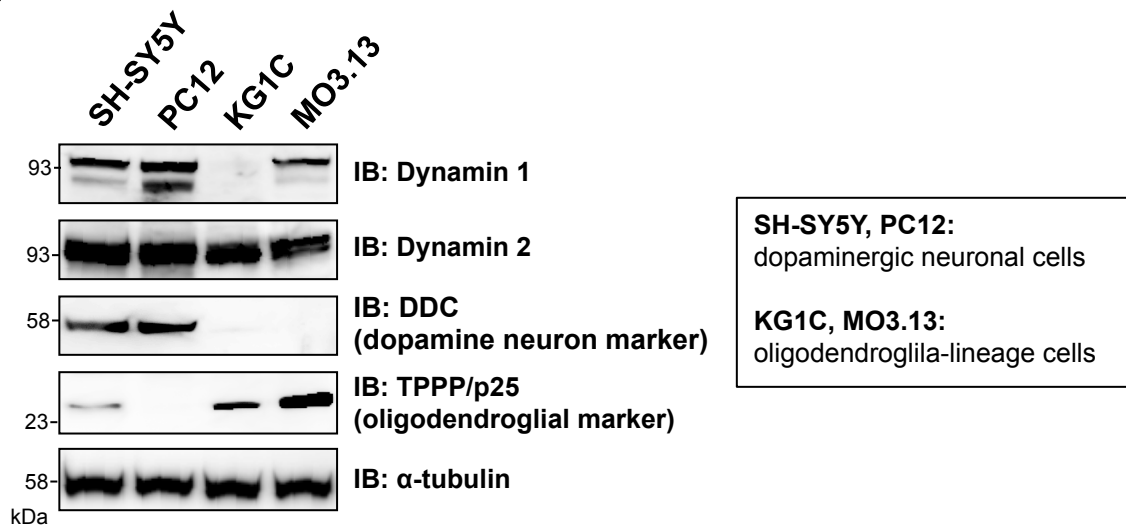
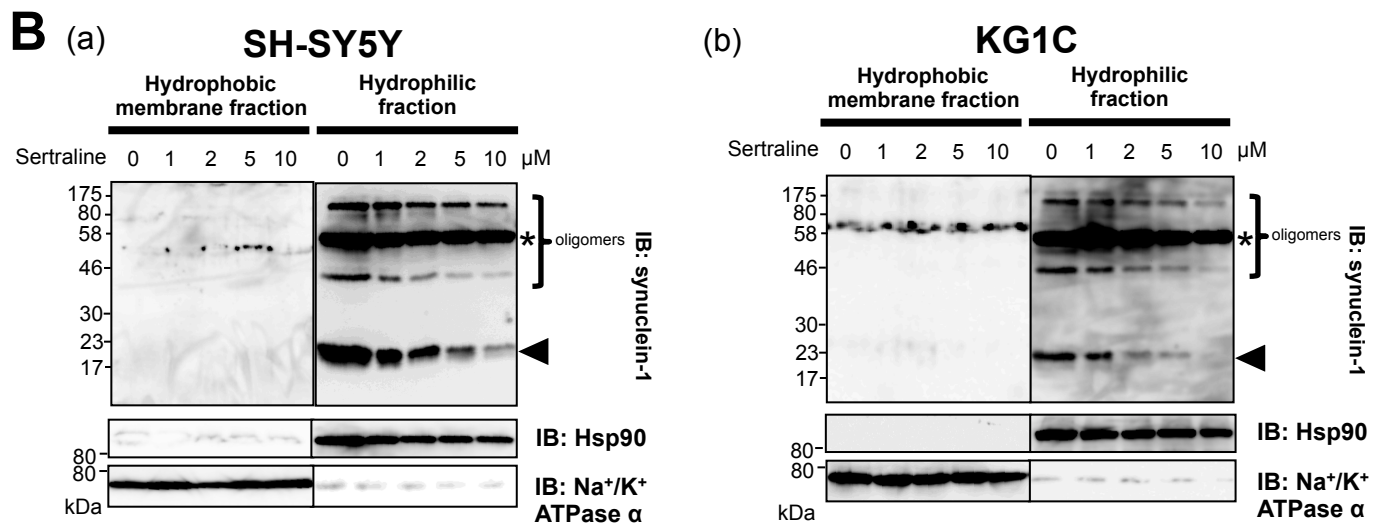


Figure 12

A



B



C

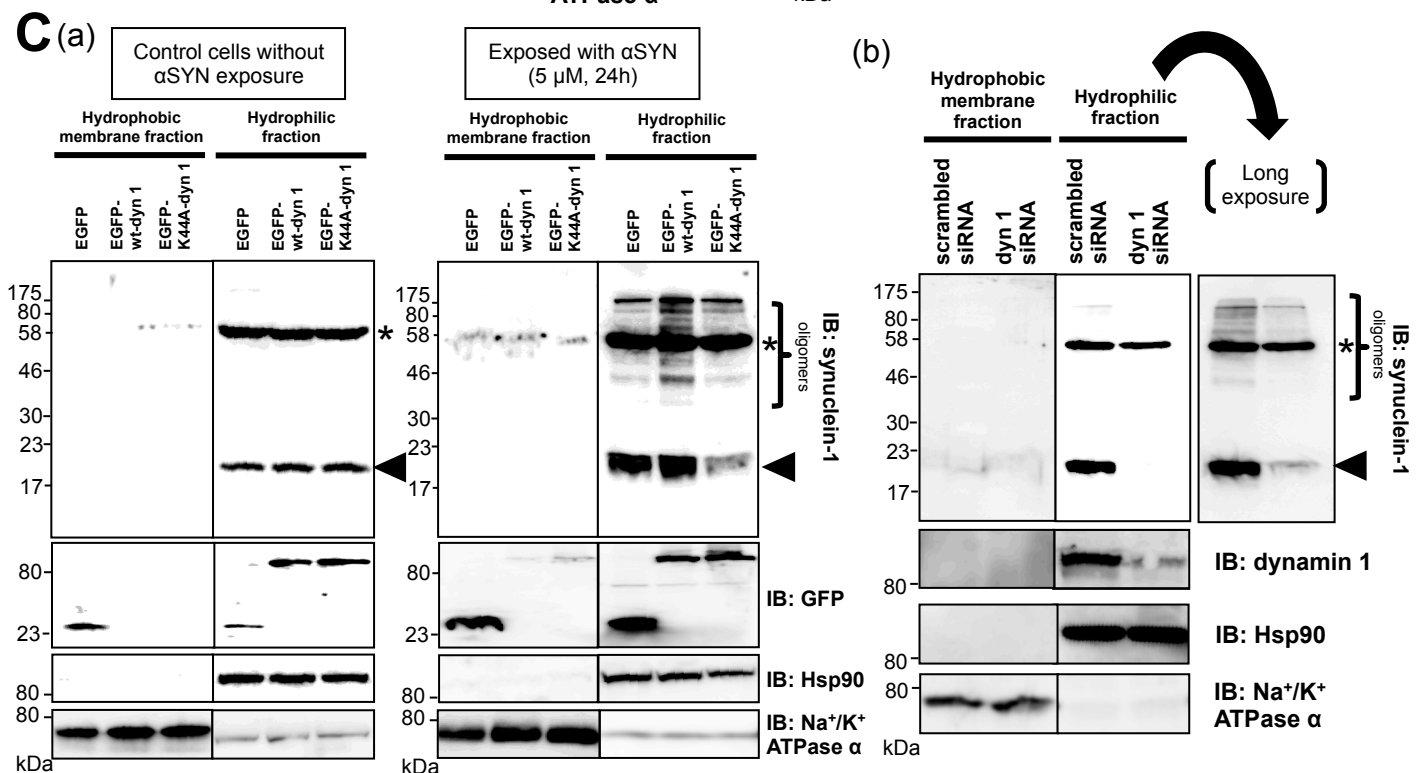
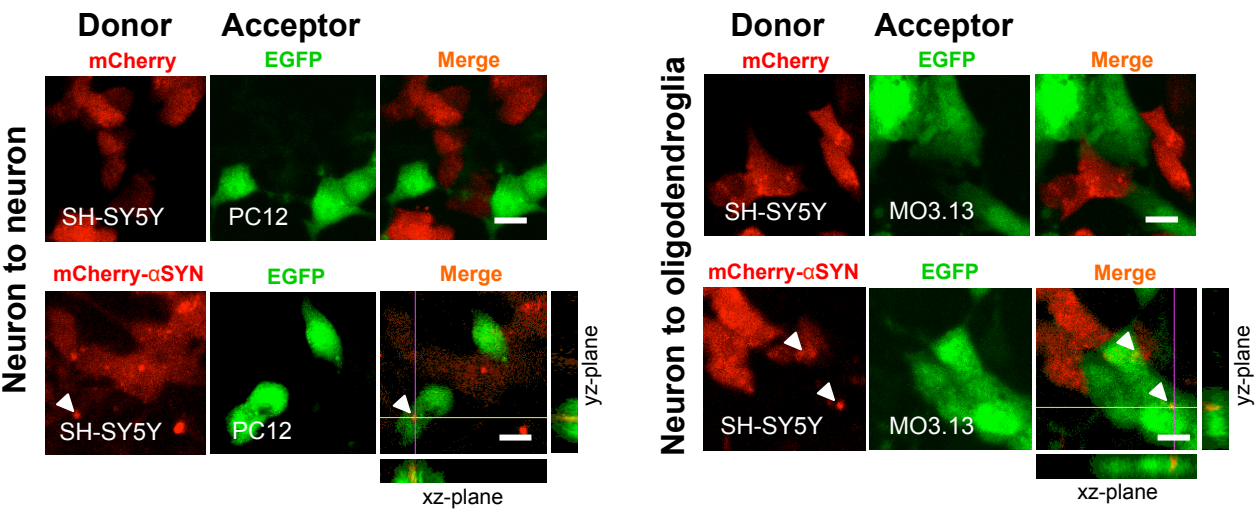
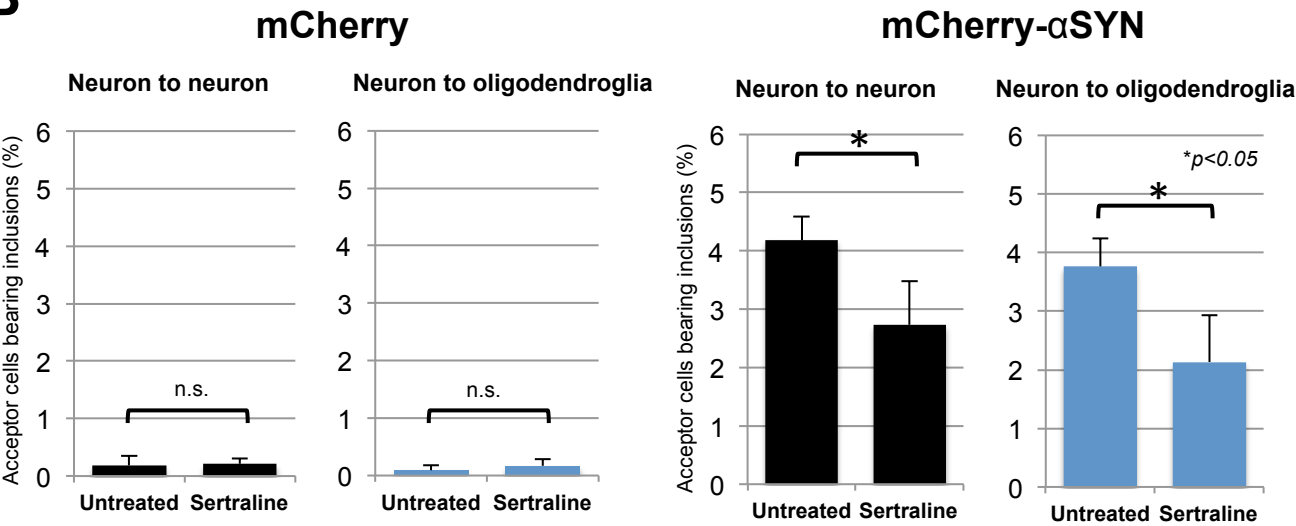


Figure 13

A



B



C

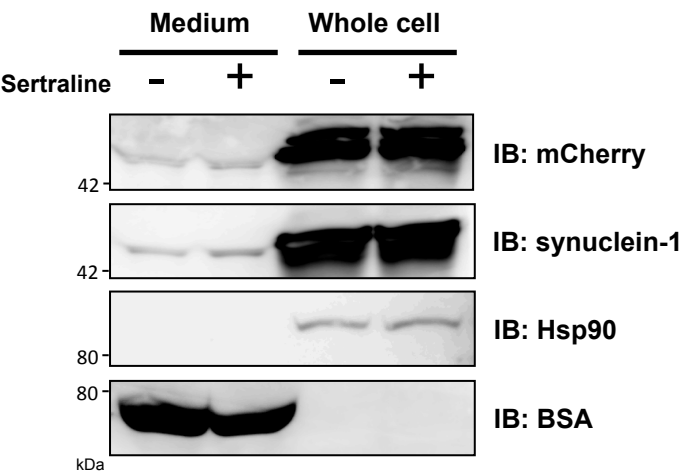


Figure 14

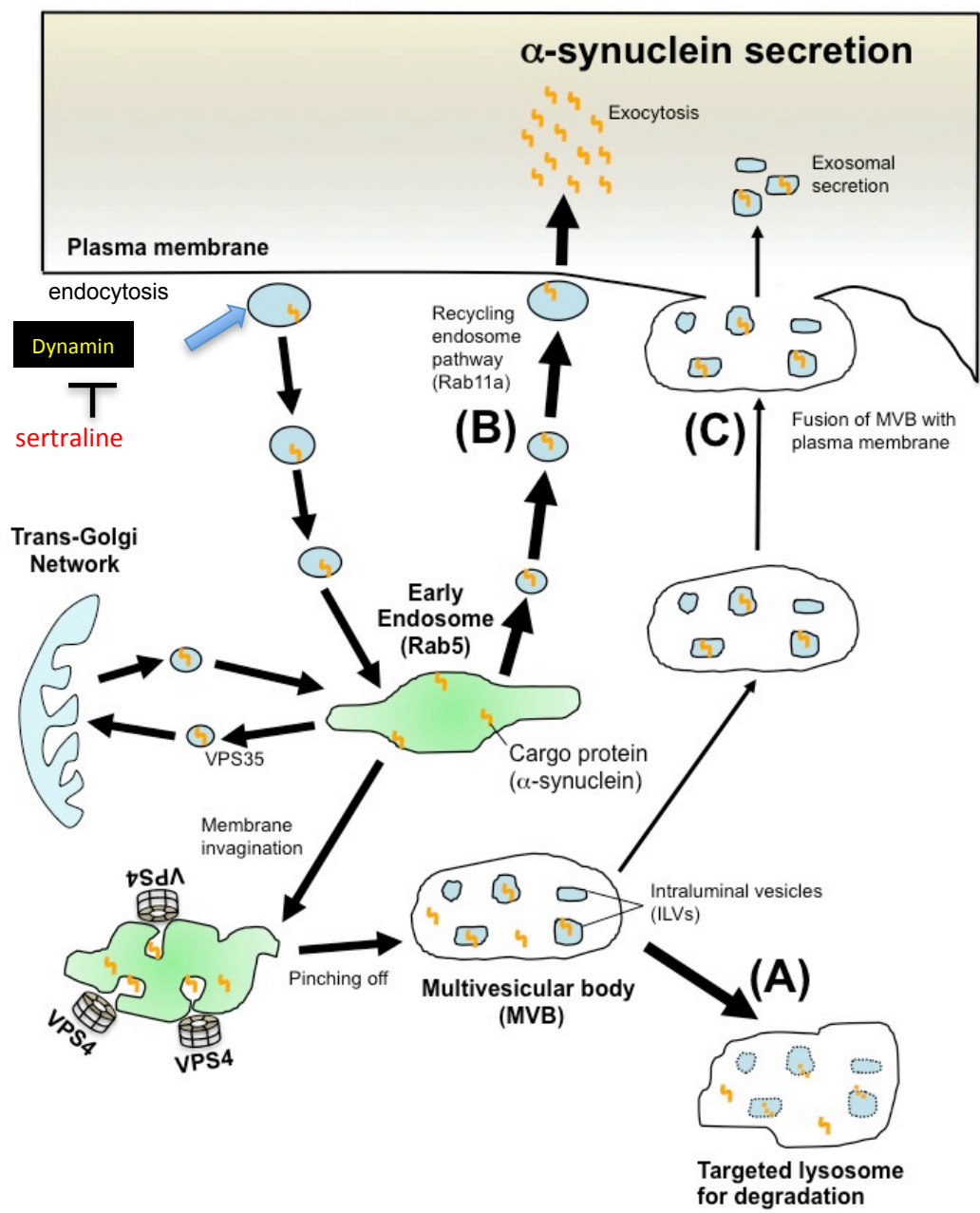


Figure 15

